



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fusarium graminearum İZOLATLARININ
MİTOKONDİRİYAL DNA VARYASYON ANALİZİ

Aylin GAZDAĞLI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Haziran, 2015

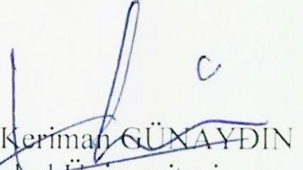
İSTANBUL

Bu çalışma 16/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

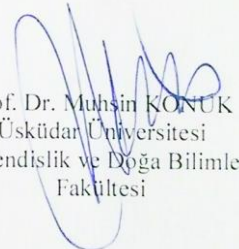
Tez Jürisi:


Doç. Dr. Gülruş ALBAYRAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Kadir TURAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi


Prof. Dr. Muhsin KONUK
Üsküdar Üniversitesi
Mühendislik ve Doğa Bilimleri
Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 43153 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans eğitimimden bu güne kadar, tecrübesi, bilgisi ve sevgisiyle desteğini her zaman arkamda hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a içten teşekkürlerimi borç bilirim.

Başta İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Prof. Dr. Nazlı ARDA olmak üzere tüm saygıdeğer öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimimden beri hocam ve çalışma arkadaşım olan değerli büyüğüm sevgili Yard. Doç. Dr. Emre YÖRÜK'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca manevi ve maddi desteği ile beni yalnız bırakmayan sevgili çalışma arkadaşım Moleküler Biyolog Gizem Gökçen YILMAZ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında kullandığım patojen organizmaları kültür koleksiyonlarından sağlayan Prof. Dr. Berna TUNALI (Samsun19 Mayıs Üniversitesi) ve Prof. Dr. Bahram SHARIFNABI'ye (Ishafan Teknoloji Üniversitesi); referans organizmaları sağlayan Theresa LEE (Seul Ulusal Üniversitesi) ve çalışma arkadaşlarına teşekkür ederim.

Deneylem esnasında jel görüntüleme çalışmalarımındaki desteklerinden ötürü Araş. Gör. Dr. Aslıhan TEMEL'e ve Araş. Gör. Uzm. Sevgi MARAKLI'ya ve tez yazımındaki yardımlarından ötürü Araş. Gör. Semih EKİMLER'e teşekkür ederim.

Beni bu güzel günlere getiren, iyi ve kötü günlerimde yanımda olan sevgili anneme, babama ve kardeşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, yüreğinin sevgiyle dolu olduğunu bildiğim, eğitim hayatımdaki azmimi kendisinden miras aldığıma inandığım ve eğitim hayatıma onun da hayallerini gerçekleştirmek için devam edeceğim rahmetli dayım Hasan Hakan ERENŞOY'a ithaf olunur.

Haziran, 2015

Aylin GAZDAĞLI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	ix
ÖZET.....	ix
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. ÖKARYOTİK HÜCRE VE MİTOKONDRİNİN KÖKENİ	2
2.2. MİTOKONDRİ GENOMU	3
2.3. MANTARLARDA MİTOKONDRİ GENOMU	5
2.4. MANTARLARDA MİTOKONDRİ GENLERİ	8
2.4.1. NADH:Ubiquinon Oksidoredüktaz	8
2.4.2. Sitokrom c Oksidaz	9
2.4.3. ATP sentaz	11
2.4.4. Ribozomal RNA'lar	12
2.5. MANTARLARDA MİTOKONDRİNİN KALITIMI	13
2.6. <i>Fusarium</i>	13
2.6.1. <i>Fusarium</i> spp. ve Mitokondri Genomu.....	14
2.6.2. <i>Fusarium graminearum</i>	15
3. MALZEME VE YÖNTEM	18
3.1. PATOJEN MATERYALİ VE ÜRETİMİ	18
3.2. mtDNA VE GENOMİK DNA İZOLASYONU	19
3.3. DNA MOLEKÜLLERİNİN NİTEL VE NİCEL ANALİZİ	20
3.4. <i>Fusarium</i> TÜRLERİNDE MİTOKONDRİ GEN İÇERİĞİ VE ORGANİZASYONUNUN ÇOKLU HİZALAMASI.....	21
3.5. PRİMER TASARIMI	22
3.6. GENLERİN PZR İLE ÇOĞALTIMI	23
3.6.1. Mitokondri Genlerinin Çoğaltımı	23

3.6.2. MAT Genlerinin Genomik DNA'dan Çoğaltımı	23
3.7. PZR ÜRÜNLERİNİN AGAROSUZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE ANALİZİ	23
3.8. PZR ÜRÜNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI.....	24
3.8.1. Bakteri Üretimi ve Transformasyona Yeterli Hücre Hazırlığı	24
3.8.2. Çoğaltım Ürünlerinin Vektöre Bağlanması, Transformasyon ve Seleksiyon	24
3.8.3. Plazmid İzolasyonu	25
3.9. DİZİLEME YÖNTEMİNE DAYALI VERİ ANALİZİ.....	26
4. BULGULAR	28
4.1. PATOJEN ÜRETİMİ	28
4.2. GENOMİK DNA VE mtDNA ANALİZ SONUÇLARI.....	29
4.3. GENLERİN REFERANS IRKLARDA ÇOKLU HİZALAMA SONUÇLARI VE TASARLANAN PRİMERLER.....	29
4.4. UNİPARENTAL KALITIMIN MAT GENLERİNİN ÇOĞALTIMI İLE GÖSTERİMİ.....	31
4.5. MİTOKONDRİ GENLERİNİN ÇOĞALTIMI VE SAFLAŞTIRILMASI	33
4.6. <i>cox3</i> GENİNİN KARAKTERİZASYONU	35
4.6.1. Dizi ve Dizi Bilgilerinin Analiz Sonuçları ve BLASTN Analizi	35
4.6.2. ORF ve BLASTP Analizi	36
4.6.3. Filogenetik Analiz Sonuçları	37
4.7. <i>atp9</i> GENİNİN KARAKTERİZASYONU	40
4.7.1. Dizi ve Dizi Bilgilerinin Analiz Sonuçları ve BLASTN Analizi	40
4.7.2. ORF ve BLASTP Analizi	41
4.7.3. Filogenetik Analiz Sonuçları	41
4.8. <i>rnl</i> GENİNİN KARAKTERİZASYONU	43
4.8.1. Dizi ve Dizi Bilgilerinin Analiz Sonuçları ve BLASTN Analizi	43
4.8.2. Filogenetik Analiz Sonuçları	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Farklı türlerin mtDNA'sında şifrelenen genler (Gray ve diğ., 1999).....4
- Şekil 2.2:** Membrana yerleşmiş olan NADH:ubikuinon oksidoredüktazın (kompleks I) şematik gösterimi (Weiss ve diğ., 1991).....9
- Şekil 2.3:** Membranda yerleşmiş olan sitokrom c oksidaz (kompleks IV) ve alt birimlerinin şematik gösterimi (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa00190). .10
- Şekil 2.4:** F₁F₀ ATP sentaz enzimi ve alt birimlerinin şematik gösterimi (Gledhill ve Walker, 2006).11
- Şekil 3.1:** *E. coli* DH5α ırkında transformasyon sonucunda elde edilen beyaz ve mavi koloniler.....25
- Şekil 4.1:** 14'ü Türkiye'de (A), 31'i İran'da (B ve C) hastalık oluşturan *F. graminearum* izolatlarıyla birlikte 2 referans ırkın (beyaz oklarla gösterilmiştir) PDA besi ortamındaki 6 günlük *in vitro* kültürleri. Bar: 3 cm.....28
- Şekil 4.2:** *F. graminearum* T2 izolatının mtDNA ve genomik DNA'sının agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Standart DNA: λHindIII (Thermo, ABD).29
- Şekil 4.3:** *F. graminearum*'a ait iki referans ırka (ACNo: NC_009493 ve DQ_364632), *F. fujikuroi* (AC No: JX_910420) ve *F. oxysporum* (AC No: AY_945289) referanslarına ait *cox3* geni nukleotid diziliminin çoklu hizalaması ile yapılan karşılaştırma analiz sonuçları.* benzer olan nukleotid dizilerini, □ primer sentezi için seçilen nukleotid dizilerini göstermektedir.....30
- Şekil 4.4:** 45 *F.graminearum* izolatu ve 2 referans ırkda idiomorfik allerlerden (A) *MAT 1*'e ait 210 bç'lik çoğaltım ürünlerinin, (B) *MAT 2*'ye ait 260 bç'lik PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 100 bç'lik standart DNA (Thermo ABD), NK: Negatif kontrol.....32
- Şekil 4.5:** Özgün primerlerle 45 izolat ve iki referans ırkta PZR ile çoğaltılan; (A) *cox3* genine ait 527 bç, (B) *atp9* genine ait 603 bç, (C) *rnl* genine ait 1527 bç ve (D) *nad2* genine ait 250-5000 bç aralığındaki ürünlerin agaroz jel elektroforezi analizi. M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA (Thermo, ABD), NK: Negatif kontrol.....34
- Şekil 4.6:** 40 izolattan çoğaltılan *cox3* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 referans genomu ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazları temsil etmektedir. PH-1 nukleotid dizilimi kutu içerisine alınarak, transversiyon ve transisyon tipindeki baz değişimlerine verilen örnekler ise kalın ve büyük puntolu bazlar ile gösterilmiştir.35
- Şekil 4.7:** 24 izolattan çoğaltılan *cox3* geninin ORF'si tarafından tayin edilen amino asit dizilerinin referansa ait dizilimlerle karşılaştırıldığı BLASTP analizine ait kısmi

- bölge.* identik amino asitleri, · tek amino asit farklılıklarını, : birden fazla amino asit farklılıklarını temsil etmektedir. Referansa ait dizilimden farklı taşınan amino asitler üzeri sarı ile boyanarak gösterilmiştir.....36
- Şekil 4.8:** *cox3* genin nukleik asit dizisinin ML analizine göre oluşturulan 41 *F. graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.....38
- Şekil 4.9:** *cox3* genin nukleik asit dizisinin MP analizine göre oluşturulan 41 *F. graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.....39
- Şekil 4.10:** 17 izolattan çoğaltılan *atp9* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 referans genomu ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazları temsil etmektedir. PH-1 nukleotid dizilimi kutu içerisine alınarak, transversiyon ve transisyon tipindeki baz değişimlerine birer örnek ise kalın ve büyük puntolu bazlar ile gösterilmiştir.....40
- Şekil 4.11:** 17 izolattan çoğaltılan *atp9* geninin ORF'si tarafından tayin edilen amino asit dizilerinin referansa ait dizilimlerle karşılaştırıldığı BLASTP analizine ait kısmi bölge.* identik amino asitleri, · tek amino asit farklılıklarını, : birden fazla amino asit farklılıklarını temsil etmektedir. Referansa ait dizilimden farklı taşınan amino asitler üzeri sarı ile boyanarak gösterilmiştir.....41
- Şekil 4.12:** *atp9* genin nukleik asit dizisinin ML analizi göre oluşturulan 41 *F. graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.....42
- Şekil 4.13:** *atp9* genin nukleik asit dizisinin MP analizi göre oluşturulan 17 *F. graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.....43
- Şekil 4.14:** 26 izolattan çoğaltılan *rnl* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 referans genomu ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazları temsil etmektedir. PH-1 nukleotid dizilimi kutu içerisine alınarak, transversiyon ve transisyon tipindeki baz değişimlerine birer örnek ise kalın ve büyük puntolu bazlar ile gösterilmiştir.....44
- Şekil 4.15:** *rnl* genin nukleik asit dizisinin ML analizi göre oluşturulan 27 *F.graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.....45
- Şekil 4.16:** *rnl* genin nukleik asit dizisinin MP analizi göre oluşturulan 27 *F. graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.....46

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>Fusarium</i> izolatları.....	18
Tablo 3.2: <i>Fusarium</i> izolatlarının <i>in vitro</i> üretiminde kullanılan besi ortamları ve içerikleri, pH 5,6.	19
Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlara ait bileşenler ve derişimleri.	20
Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan özgün primer dizileri.....	23

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fusarium graminearum İZOLATLARININ MİTOKONDRIYAL DNA VARYASYON ANALİZİ

Aylin GAZDAĞLI

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Bu yüksek lisans tez çalışmasında; filamentli mantarlardan biri olan *Fusarium graminearum*'un izolatları arasındaki filogenetik ilişki, mitokondri genlerinin çeşitliliği belirlenerek kuruldu. Bu amaçla Kore Cumhuriyeti'nden sağlanan 2 referans ırkla birlikte Türkiye ve İran'ın farklı coğrafi bölgelerinden saflaştırılmış 45 izolatın mitokondri genomunda kodlanan *cox3*, *atp9*, *rnl* ve *nad2* genlerinin moleküler karakterizasyonu yapıldı. Genlerin özgün bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldıktan sonra Sanger yöntemine göre dizilendi. Elde edilen nukleotid dizilimleri CLUSTALW programı kullanılarak hizalandı ve kodlama bölgelerindeki mitokondri DNA (mtDNA) varyasyonları tarandı. İzolatlar arasındaki filogenetik ilişkiler maksimum olabilirlik (ML) ve maksimum sıklık (MP) metodlarına göre hizalama verileri temel alınarak oluşturuldu. Ayrıca, kodlama bölgeleri ile ilişkili olan mutasyonların açık okunma çerçevesinde (ORF) neden olduğu varyasyonlar ORF-TARAMA ile analiz edildi.

cox3 genine ait 527 bç'lik fragmentler 46 izolattan elde edildi. *atp9*'a ait 603 bç'lik ürünler 21 izolattan çoğaltılırken *rnl*'ye ait 1547 bç'lik ampliconlar 45 izolattan elde edildi. 44 izolatta *nad2* genine ait beklenen tek bir ürün (5192 bç) yerine, boyutları 250 bç-5 kb arasında değişen polimorfik bantlar çoğaltıldı. Bu nedenle *nad2* geni, varyasyon analizi çalışmasından çıkartıldı. *cox3*, *atp9* ve *rnl* genlerine ait kısmi dizilimler hizalandıktan sonra, BLASTN analizi ile her üç gende de kodlama bölgelerinde transisyon ve transversiyon tipindeki tek nükleotid değişimlerine ek olarak delesyonlu ve insersiyonlu bölgelerin varlığı gösterildi. Mutasyonların çoğunlukla 1 kodonun değişimi ile sonuçlandığı, ayrıca çerçeve kaymasına yol açarak birden fazla kodonu de

değiştirebileceği gösterildi. Nukleotid varyasyonlarının ML ve MP analizi izolatlar arasındaki filogenetik ilişkinin kurulmasını sağladı. Oluşturulan filogenetik ağaçlarda, izolatların uzaklıkları ile genlerde taşınan nukleotid varyasyonlarının uyumlu olduğu gösterildi. İzolatlar arasındaki benzerlik “neighbor-joining” (NJ) algoritması ile hesaplandı. Karakter ve mesafe temelli analizlerle elde edilen verilerin uyumlu olduğu da gösterildi. Ek olarak *F. graminearum*'un uniparental kalıtımı nuklear DNA'da (nDNA) taşınan MAT lokuslarının analizi ile ilişkilendirildi. Bu amaçla 47 izolatta MAT-1 idiomorfunun 210 bç boyutundaki α -kutu domeni ve MAT-2 idiomorfunun 260 bç boyutundaki HMG kutu domeni PZR ile çoğaltılarak gösterildi.

Bu yüksek lisans tezi filogenetik ilişkinin mitokondri genlerinin dizilenmesi ile *Fusarium* türlerinde ortaya konması bakımından özgün değere sahiptir. Uygulanan metodoloji diğer fitopatogenlerin karakterizasyonunun yapılmasına örnek oluşturacaktır.

Haziran 2015, 70 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Fusarium graminearum*, mitokondri DNA'sı, dizileme, filogenetik ilişki.

SUMMARY

M. Sc. THESIS

MITOCHONDRIAL DNA VARIATION ANALYSIS of *Fusarium graminearum* ISOLATES

Aylin GAZDAĞLI

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Gülruh ALBAYARAK

The phylogenetic relationship among *Fusarium graminearum* isolates, one of the filamentous fungi, was constructed by the determination of mitochondrial genes. For this purpose the *cox3*, *atp9*, *rnl* and *nad2* genes coded in mitochondrial genome of 45 isolates purified from different geographic regions of Turkey and Iran together with 2 reference strains obtained from the Republic of Korea were molecularly characterised. After specific gene regions were amplified by polymerase chain reaction (PCR), they were sequenced according to the Sanger method. The obtained nucleotide sequences were aligned by using CLUSTALW programme, and mitochondrial DNA (mtDNA) variations in coding regions were scanned. The phylogenetic relationships among isolates were constructed using the maximum likelihood (ML) and maximum parsimony (MP) methods based on alignment data. Moreover, variations caused by mutations, related to coding regions, on open reading frame (ORF) were analysed by ORF-FINDER.

527 bp fragments, belonging to *cox3* gene, were obtained from 46 isolates. 603 bp products, belonging to *atp9*, were amplified from 21 isolates, whereas 1547 bp amplicons, belonging to *rnl*, were obtained from 45 isolates. In lieu of only one expected 5192 bp product belonging to *nad2*, polymorphic bands whose lengths varied from 250 bp to 5 kb were amplified in 44 isolates. Therefore, the *nad2* gene was discarded from the variation analysis study. After the alignment of partial sequences of *cox3*, *atp9* and *rnl* genes, the existence of single nucleotide polymorphisms, types transition and transversion, as well as the existence of regions with deletions and insertions in the coding regions of all the three genes were revealed via BLASTN

analysis. It was demonstrated that mutations mostly result in one codon change, and also can change more than one codon by leading to frame shift. The ML and MP analysis of nucleotide variations provided the establishment of phylogenetic relationships among isolates. The compatibility between isolate distances and nucleotide variations, carried inside the genes, is shown on the constructed phylogenetic trees. Similarities among isolates were calculated with the “neighbor-joining” (NJ) algorithm. The compatibility of the data obtained from character and distance based analysis was also shown. Moreover, *F. graminearum*'s uniparental inheritance was correlated with the analysis of MAT locus found in nuclear DNA (nDNA). For this purpose, the 210 bp α -box domain of the *MAT-1* idiomorph, and the 260 bp HMG box domain of the *MAT-2* idiomorph were demonstrated in 47 isolates by PCR amplification.

This master thesis is the first study where the phylogenetic relationship is revealed via the sequencing of mitochondrial genes in *Fusarium* species, thus rendering the study original. The applied methodology will exemplify the characterisation of other phytopathogens.

June 2015, 70 pages.

Keywords: *Fusarium graminearum*, mitochondrial DNA, sequencing, phylogenetic relationship.

1. GİRİŞ

Mitokondri, ökaryotik hücrelerde oksidatif fosforilasyonla enerji üretiminden sorumlu olan kendi genetik sistemine sahip bir organeldir. Mitokondri DNA'sı (mtDNA) organel başına çok kopyalı olarak taşınmaktadır ve nuklear DNA'ya (nDNA) oranla çok daha fazla sayıda mutasyon biriktirmektedir. Bu nedenle ökaryotların filogenisinin çıkarılmasında ve organizmaların alt tür düzeyinde tanımlandığı populasyon genetiği çalışmalarında mtDNA'sı tercih edilmektedir. Askı mantarlardan *Fusarium graminearum* her yıl dünya genelinde farklı bitki türlerinde hastalığa neden olarak ürün ve dolayısıyla ekonomik kayıplara yol açmaktadır. *F. graminearum*'a ait izolatların tanımlanması ve bireyler arasındaki ilişkinin ortaya konması patojen organizma ile mücadele stratejilerinin geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Bu nedenle yüksek lisans tez projesi kapsamında Türkiye ve İran'da mısır, arpa ve buğday bitkilerinde hastalık etmeni olan 45 *F. graminearum* izolatu ile iki referans ırkın mitokondri genomunda taşınan, ökaryotik hücrelerin birçoğunda ortak olan dört genin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla elektron transfer zincirinde (ETZ) bulunan ATP sentez alt birim 9, NADH:ubikuinon oksidoredüktaz alt birim 2, sitokrom c oksidaz alt birim 3 proteinlerini şifreleyen genler ve translasyonda görevli büyük alt birim ribozomal RNA (rRNA)'yı şifreleyen gen seçilmiş ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile klonlanarak dizilenmiştir. Elde edilen verilerin biyoinformatik analizi, önemli işleve sahip olan bu genlerin nukleotid dizilimlerinde farklılıklar (delesyonlar ve insersiyonlar) olduğunu, tek nukleotid polimorfizmlerinin bulunduğunu, bu varyasyonların açık okuma çerçevesini (ing., open reading frame-ORF) değiştirebileceğini göstermiştir.

2. GENEL KISIMLAR

Ökaryotik hücreler oksijenli solunumla enerji üretiminden sorumlu olan, yaşlanma ve apoptoz süreçlerinde de etkin rol oynayan mitokondri adı verilen endosimbiyotik organellere sahiptir (Andersson ve Kurland, 1999; Pereira ve diğ., 2008; Basse, 2010). Genomundaki bazı genleri evrimsel süreçte kaybeden ya da konak hücre genomuna aktaran endosimbiyont zaman içerisinde konak hücreye bağımlı bir organel haline gelmiştir (Gray ve diğ., 2001). mtDNA'sının analizi, divergensin hassas biçimde ortaya konmasını, aynı zamanda tür içinde bireylerin alt tür düzeyinde tanımlanmasını sağlar. Bu nedenle çeşitli organizmalarda mtDNA'sının analizi ile hem filogenetik çalışmalar gerçekleştirilmekte hem de türlerin taksonomisine katkı sağlanmaktadır (Kim ve diğ., 1992).

Asklı mantarlardan bitki patojeni *Fusarium* türlerinde de mtDNA'sının analizine yönelik çalışmalar başlatılmıştır. Üç farklı *Fusarium* türünde (*F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*) RFLP (ing., restriction fragment length polymorphism) markır analizine dayalı olarak gerçekleştirilen çalışmalarla filogenetik ilişkilerin kurulması hedeflenmiş, *F. oxysporum*'da ise bireyler bu yaklaşımla alt tür düzeyinde ayırt edilmiştir (Kim ve diğ., 1992; Kim ve diğ., 1993; Láday ve diğ., 2004a; Láday ve diğ., 2004b).

2.1. ÖKARYOTİK HÜCRE VE MİTOKONDRİNİN KÖKENİ

Günümüzde bilinen tüm modern ökaryotik hücrelerin mitokondriye sahip ortak bir atadan evrildikleri düşünülmektedir. Ancak nükleus, endomembran sistemi, kromozom organizasyonu ve kırılma gibi ökaryotlara özgün yapı ve süreçlerin tam olarak ne zaman kazanıldığı kesin olarak bilinmemektedir (Poole ve Penny, 2006). Karşılaştırmalı genomik çalışmalar; (1) bakteri genleri ile yüksek dizi benzerliğine sahip gen ailelerinin, (2) arke genleri ile yüksek dizi benzerliği gösteren genlerin ve (3) sadece ökaryotik hücrelere özgün genlerin ökaryotik genomlarda bulunduğunu göstermiştir. Ökaryotik hücrelerin ve mitokondrilerin kökenlerini açıklamaya yönelik çok sayıda

hipotez ortaya atılmıştır. Bu hipotezler, birden fazla hücrenin füzyonu ya da endosimbiyoz temeline dayandırılmıştır (Andersson ve diğ., 1999).

Füzyon temelli hipotezlerde iki hücre füzyonu ile ökaryotik hücre yapısının ve genomunun meydana geldiği, endosimbiyozla bir üçüncü hücrenin, hücre içine alınarak mitokondrinin kazanıldığı savunulmuştur (Poole ve Penny, 2006).

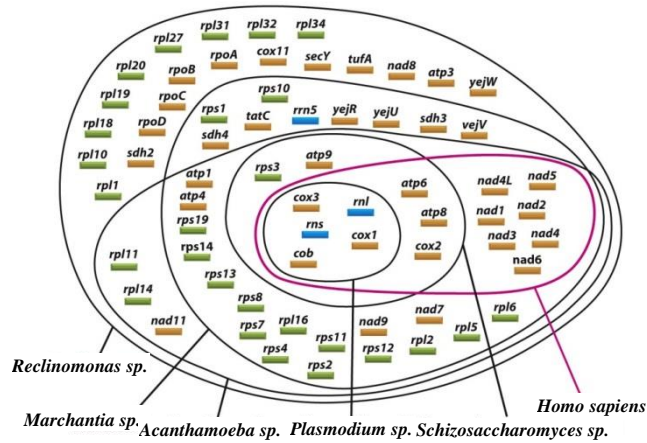
Lynn Margulis (1960) tarafından geliştirilen endosimbiyoz kuramında ise mitokondrinin prokaryotik atasal aerobik hücrenin ilkel ökaryotik konak hücre içerisine parazit ya da sindirilemeyen bir besin olarak girmesi sonucu kazanıldığı savunulmaktadır. Bu ilişkide aerobik bakteri konak hücreye ait besinleri kullanıp hayatta kalmış, endosimbiyoz sırasında aerobik hücreyi bir kılıf gibi saran konak hücreye ait membran, bakterinin hücre içerisinde varlığını sürdürmesine katkı sağlamıştır. İlkel ökaryotik hücre ile aerobik bakteri hücresi arasındaki simbiyotik ilişki (konak hücreye ait besinleri kullanarak hücre içinde varlığını sürdürme) zaman içerisinde mutualistik (her iki tarafın da karşılıklı fayda sağladığı) ilişkiye dönüşmüştür. Konak hücre enerji ihtiyacını karşılama bakımından aynı ortamı paylaştığı diğer hücrelerden daha avantajlı duruma gelmiş, daha fazla enerji üreterek ortam şartlarındaki değişimlere daha hızlı uyum sağlamıştır. Milyonlarca yıl süren evrim sürecinde prokaryotik hücre, genlerinin bir kısmını kaybederek ökaryotik hücreye bağımlı bir organel haline gelmiştir. Tüm genomu dizilenmiş mitokondrilerde gerçekleştirilen analizler gen kaybının hala devam eden evrimsel bir süreç olduğunu göstermektedir (Gray, 1999; Gray ve diğ., 2001). Günümüzde mitokondri hücre içinde oksidatif fosforilasyon ile enerji üretiminden sorumlu organel olarak görev yapmaktadır (Andersson ve Kurland, 1999).

2.2. MİTOKONDRİ GENOMU

Filogenetik çalışmalar ve filogenomik modellemeler mitokondrinin monofiletik yani tek bir ortak atadan geldiğini işaret etmektedir. Ribozomun büyük ve küçük alt biriminde bulunan rRNA genleri ile yapılan karşılaştırmalı analizler bakterilerde ve mitokondrilerde bulunan bu genlerin kümeler halinde bulunduğu, operonlarda benzer düzenlenimlere sahip olduğu hatta gen içerisinde var olan delesyonların pozisyonlarının bile aynı olduğu ortaya koymuştur (Gray, 1999). rRNA genleri ve ısı şoku proteinlerine ait dizi temelli filogenetik analizler mitokondrilerin α -proteobakterilerden kökenlenmiş

olabileceğini göstermektedir (Andersson ve diğ., 1998). *Rickettsiales* takımı üyeleri ile mitokondrinin yaklaşık 1,5 - 2 milyar yıl önce atmosferde moleküler oksijen seviyesinin artmasıyla ortak bir atadan bağımsız olarak evrildikleri, modern mitokondrilerde bulunan pek çok özelliği α -proteobakterilerle paylaştığı ortak atadan aldığı düşünülmektedir. Dizi benzerliğinin özellikle *Rickettsia*, *Anaplasma* ve *Ehrlichia* cinslerinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *Rickettsiales* takımından genomu dizilenmiş ilk hücre içi paraziti, *R. prowazekii*, mitokondri gen içeriği ve metabolizması ile yüksek düzeyde benzerlik taşımaktadır. Her ikisi de başta piruvat olmak üzere glikolizle oluşmuş metabolitleri kullanmaktadır. Piruvat oksidasyonu ve ATP üretimi aynı mekanizma ile gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, *R. prowazekii* hücre membranı ile mitokondri iç membranında ADP/ATP translokaz enzimlerinin taşınması önemli bir yapısal ortak özelliktir (Müller ve Martin, 1999).

Atasal mitokondri genomu ile yüksek benzerlik taşıdığı düşünülen *Reclinomonas americana*'nın mitokondri genomuna ait nukleotid dizilimi mtDNA'sının günümüze kadar çok az değişikliğe uğradığını desteklemiştir. *R. americana* halkasal mtDNA'sı yaklaşık 69 kilobaz (kb) boyutundadır ve şimdiye kadar moleküler analizleri yapılan mitokondri genomlarından daha fazla sayıda gen taşımaktadır (Şekil 2.1). *R. americana* mtDNA'sında operon benzeri gen kümeleri bulunmaktadır. Transfer RNA'ların (tRNA) sekonder yapıları bakteri hücrelerindeki gibi oldukça benzerdir. Protein kodlanmasından sorumlu genlerin yukarı bölgelerinde (ing., upstream) bulunan "Shine-Dalgarno" benzeri dizileri hayvan, bitki, mantar ve tek hücrelilere ait mtDNA'larında bulunandan oldukça farklıdır (Andersson ve diğ., 1998; Gray, 2012).



Şekil 2.1: Farklı türlerin mtDNA'sında şifrelenen genler (Gray ve diğ., 1999).

Günümüzde farklı organizmalara ait mitokondri genomları klonlama ve dizileme yaklaşımları ile incelenmekte, genlerin moleküler karakterizasyonu ve işlevleri üzerine detaylı çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bir mitokondrinin biyogenezinden yaklaşık 1500 protein sorumludur. Türler arasında sayısı değişmekle birlikte bu proteinlerden sadece 13'ü oksidatif fosforilasyon için esaniyeldir ve mitokondri genomu tarafından şifrelenmektedir. Mitokondri, solunum ve organelin hücre bölünmesi sırasında kendini eşlemesi gibi birçok işlevi için nDNA'da kodlanan gen ürünlerine ve bazı küçük RNA moleküllerine (özellikle tRNA'lar) bağımlıdır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda; oksijenli solunumda görevli proteinlerden NADH:ubiquinon oksidoredüktazı (kompleks I), süksinat dehidrogenazı (kompleks II), sitokrom c oksidazı (kompleks IV), ATP sentazı (kompleks V) şifreleyen genlerin kısmi ya da bütün olarak mitokondri genomunda yer aldığı, translasyonda görevli ribozomların büyük ve küçük alt birimlerinde bulunan rRNA'ların tümünü ve tRNA'ların bir kısmını şifreleyen genlerin de taşındığı gösterilmiştir. Ek olarak bazı türlerde ribozomal proteinleri (r-proteinleri) şifreleyen genlerin de mtDNA'da bulunduğu bilinmektedir (Gray, 1999; Scheffler, 2008).

2.3. MANTARLARDA MİTOKONDRI GENOMU

Mantarlarda mitokondri genomu halkasal ya da doğrusal çift iplikli DNA moleküllerinden meydana gelmekte, organel başına da çoklu genom taşınmaktadır. Doğrusal molekülde serbest 3'-OH ve 5'-PO₄ uçlar bulunmamaktadır. Plazmidlerde de çift iplikli DNA molekülü, genom organizasyonuna göre halkasal veya doğrusal olabilmektedir. Plazmid sayısı türden türe farklılık göstermektedir. Mitokondri genom boyutu, parçalı genlerde bulunan intronların tipi (grup I ve grup II), sayısı ve intronların nukleotid dizilimlerine ve AT'ce zengin bölgelerin varlığına bağlı olarak türler arasında yüksek değişkenlik (40-60 kb) göstermektedir (Hausner, 2003). *Schizosaccharomyces pombe*'de mitokondri genom boyutu 20 kb gibi küçük bir değer alabilirken *Agaricus bisporus*'de 170 kb'a ulaşabilmektedir. Mantarlarda mitokondri genom boyutu hayvanlarınkinden 4 kat daha büyük olabildiği gibi bitki mitokondri genomları ile karşılaştırıldığında oldukça küçük kalabilmektedir (Scheffler, 2008).

Mantarlarda mitokondri genomunda şifrelenen genler üç farklı grupta toplanabilir; (1) translasyonda görevli RNA'ları kodlayan genler: ribozomların büyük ve küçük alt

birimlerinde bulunan rRNA genleri (*rns* ve *rnl*) ile tRNA genleri (*trnA-W*), (2) solunum zincirinde görevli proteinleri kodlayan genler: sitokrom c oksidaz alt birim genleri (*cox1*, *cox2*, *cox3*), apositokrom b geni (*cob*), NADH:ubiquinon oksidoredüktaz alt birim genleri (*nad1-6*) ve ATP sentazın alt birim genleri (*atp6*, *atp8* ve *atp9*), (3) ribozomun küçük alt biriminin oluşturulması için ihtiyaç duyulan r-proteinleri şifreleyen genler (*rps3*, *var1* ve *S5*) (Hausner, 2003).

Mantarların mitokondrisinde taşınan tRNA genlerinin sayıları türler arasında farklılık göstermektedir. Özellikle asklı mantar türlerinde bu fark *nad* genlerinin varlığı ile ilişkilidir. Öncül tRNA moleküllerinin 5' ucunun olgunlaşmasından bir ribozim olan RNazP sorumludur. RNazP'nin RNA'sını şifreleyen gen *Zygomycetes* ve *Ascomycetes* sınıflarına ait türlerin mitokondrilerinde bulunurken, *Chytridiomycota* filumu bu geni taşımamaktadır (Forget ve diğ., 2002). Mantarlarda mt-rRNA genleri tek kopyalı olarak taşınır ve 5S rRNA geni bulunmaz. (Hausner, 2003).

Mantarlar aleminde mitokondri genomlarının boyutları arasındaki büyük farklılık öncelikle intronların tipi (grup I ve II), sayısı, dizilimleri ile intronların ve intron bölgelerinin dahil olabildiği ORF'lerin varlığından kaynaklanmaktadır. Örneğin; 62 kb uzunluğundaki *Neurospora crassa* mtDNA'sında intronlar 20 kb'lık bir alanı kaplamaktadır. *Podospora anserina*'nın 100 kb'lık mitokondri DNA'sında taşınan 36 intron ve intron bölgeleri tarafından kodlanan ORF'lerin uzunluğu 60 kb'ı bulmaktadır (Cummings ve diğ., 1990). Hatta *P. anserina*'nın mitokondri genomunda kodlanan *cox1* geninin (24,5 kb) 16 adet intronu bulunmaktadır (Cummings ve diğ., 1989). Bazı mantar türlerinde çok az sayıda intron olduğu bilinmektedir. Örneğin 19431 baz çifti uzunluğundaki *S. pombe* mitokondri genomunda sadece üç intron bölgesi yer almaktadır (Lang, 1984). Birçok mantar türünde mtDNA'sı boyut farklılığından genler arasındaki bölgelerde bulunan AT bakımından zengin adacıklar da sorumludur. DNA replikasyonunda gerçekleşen hataların veya DNA onarım sistemindeki bozuklukların, AT adacıklarının genomdaki düzensiz dağılımına yol açan mekanizmalar olabileceği düşünülmektedir. Bu bölgeler yapısal olarak mtDNA'sında kararlı saç tokası yapılarını oluşturmakta ek olarak rekombinasyonun meydana geldiği bölgeler olarak da göze çarpmaktadır. Biyolojik işlevi tam olarak anlaşılmasa da adacıkların genomda düzenleyici olarak görev aldığı veya geçmişte endosimbiyont genom ile nuklear genom

arasındaki simbiyotik ilişkide görev almış olabileceği düşünülmektedir (Hausner, 2003; Scheffler, 2008).

Mantarlarda mitokondri genomlarında bulunan grup I ve grup II intronları nukleotid dizilimi, yapısı ve kırılma mekanizmasına göre sınıflandırılmaktadır. Bu bölgeler protein kodlayan genler ile rDNA dizileri arasında yaygınken tRNA genlerinde bulunmaz. Grup I ve grup II intronları *P. anserina*'da maternal olarak kalıtılan senesens ile ilişkili iken mayalarda ve asklı mantarlarda mtDNA'sının yeniden düzenlenmesinden (rekombinasyon) sorumludur (Dujon, 1989; Griffiths, 1992). *Neurospora*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces* ve *Saccharomyces* türleri arasında yapılan karşılaştırmalı analizler mitokondri genomundaki intron bölgelerinin hareketli olduğunu ve nesillere aktarıldığını göstermektedir (Hausner, 2003). İntronların hareketi genomda mutasyonlara neden olmaktadır. Mantarlarda yaygın olarak bulunan grup I intronlarının nukleotid dizilimi diğer organizmaların organel genomlarından farklıdır. Ancak sekonder ve tersiyer yapıları bakımından oldukça korunmuşlardır. Grup I intronlarında bulunan ORF'lerden maturaz ve/veya endonukleaz aktivitesi gösteren proteinler şifrelenmektedir. Mantar mitokondri genomlarında bulunan grup I kodlu ORF'lerin *rps3* ribozomal proteinini, bölgeye özgün endonukleazı, maturazı ve maturaz benzeri protein ve enzimleri şifrelediği rapor edilmiştir. Grup I intronlarının büyük alt birim rRNA geni içindeki uzunlukları türe bağlı olarak 1,1 kb ile 4,2 kb arasında değişmektedir. Maturaz benzeri proteinler yüksek korunmuşluk gösteren simetrik şekilde düzenlenmiş özgün amino asit bakiyeleri taşımaktadır. Maturazlar intronun uygun bir şekilde katlanarak kendi kendine kırılmasını kolaylaştırmaktadır. Mantarlarda bitki ve tek hücrelilerin mitokondri genomlarına göre daha az sayıda grup II intronu taşınmaktadır. Bu intronların atasal nuklear öncül mRNA (ing., messenger RNA) intronları olduğu düşünülmektedir. Mantarlarda grup II intronlarının varlığı mitokondride protein kodlayan genlerde ve özellikle büyük ve küçük alt birim rRNA genlerinde saptanmıştır. Hareketli olan grup II intronlarında ribozim aktivitesinden yaklaşık 600 nukleotidlik bir bölge sorumludur. Grup II intronları üç aktivitesi olan çok işlevli bir proteini şifrelemektedir. Neredeyse bütün grup II kodlu ORF'ler ters transkriptazla homolog bir segmente sahiptir. Ayrıca X domeni olarak bilinen bölgesi RNA kırılmasından sorumlu olan maturaz domeni olarak da düşünülebilir. Diğer bir domen ise endonukleaz aktivitesine sahip Zn parmak motifli Zn domenidir. Ancak

birkaç mantar türünde mitokondri grup II intronları Zn domenini kaybetmiştir (Hausner 2003).

20. yüzyılda bilişim teknolojisindeki ilerlemelere, özgün algoritmaların oluşturulmasına, yeni laboratuvar tekniklerinin ve cihazlarının geliştirilmesine paralel olarak medikal ve ekonomik değere sahip organizmalarla yapılan populasyon genetiği ve filogenetik çalışmalarda karşılaştırmalı analizler mtDNA'sı kullanılarak gerçekleştirilmektedir. mtDNA'sı nDNA'ya oranla daha hızlı evrim geçirdiğinden sadece türler arasında evrimsel ilişkinin kurulmasını sağlamakla kalmaz aynı zamanda alt tür düzeyinde ayırım yapılmasına da imkân tanır. Bitki ve hayvanlarda organel genomları, protein kodlama dizilerindeki ORF'ler için geliştirilen evrensel primerlerin kullanımı ve gerçekleştirilen hizalama analizleri ile karşılaştırılabilmekte iken mantarlarda çok sınırlı kalmıştır. Çünkü mantar mitokondrilerinin protein kodlanmasından sorumlu ORF'lerinde taşınan büyük boyutlu yaygın intronlar evrensel primer tasarımını engellemektedir (Kretzer ve Bruns, 1999). Bu nedenle mantarlarda tür düzeyinde organel genomu analiz edilerek filogenetik çalışmalar ve filogenomik modellemeler gerçekleştirilmektedir.

2.4. MANTARLARDA MİTOKONDİRİ GENLERİ

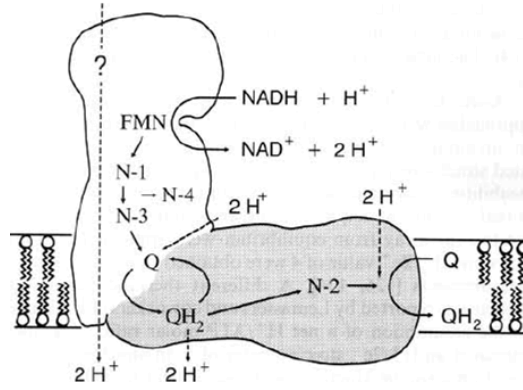
Mantarlar aleminde tRNA ve protein şifreleyen mitokondri genlerinin sayısı türler arasında oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu farklılık, mtDNA'sı ile nDNA arasında gerçekleşen rekombinasyonla meydana gelen gen transferlerinin bir sonucudur. Mitokondrideki ETZ'de yer alan çok alt birimli NADH:ubiquinon oksidoredüktaz, ubiquinol:sitokrom c oksidoredüktaz (kompleks III), sitokrom c oksidaz ve ATP sentaza ait alt birimlerin bir kısmı mitokondride bir kısmı nDNA'da kodlanmaktadır. Mitokondride bulunan ribozomların yapısına katılan rRNA'lar ve ayrıca bazı tRNA moleküllerine ait genlerin bir kısmı mtDNA'sı tarafından şifrelenmektedir (Aguileta ve diğ., 2014).

2.4.1. NADH:Ubiquinon Oksidoredüktaz

ETZ'nin ilk elektron alıcısı ve en büyük enzim kompleksi olan NADH:ubiquinon oksidoredüktaz (kompleks I), NADH molekülünün oksidasyonunu membrana yerleşmiş ubiquinonun indirgenmesiyle eşleştirir. Bu sırada çok alt birimli enzim tarafından üretilen NADH molekülleri kontrollü olarak tekrar oksidasyona uğratılır. Bu şekilde hücrenin

oksidatif strese maruz kalması engellenmiş olur. Aynı zamanda enzim NADH/NAD⁺ ve kuinol/kuinon redoks çiftlerinden elde edilen serbest enerji protonları membran çiftlerinden getiren proton hareket kuvvetine dönüştürür (Grivennikova ve diğ., 2007).

NADH:ubikuinon oksidoredüktazın yapısı asklı mantarlardan *N. crassa*'da aydınlatılmıştır. Enzim mitokondri iç membranı üzerinde 30 adet alt birimin bir araya gelmesiyle işlev kazanmaktadır (Şekil 2.2). Kompleks I'e ait 30 alt birimi şifreleyen genin çoğu nDNA'da bulunmaktadır. Kompleksin membranı yatay olarak geçtiği bölgesinde bulunan alt birimlerine ait genler mitokondride şifrenlenmektedir. Hidrofilik alt birimlere ait polipeptidler ise nukleusta transkripsiyonla sentezlendikten sonra sitoplazmadan mitokondriye transfer edilmektedir (Sackman ve diğ., 1991).



Şekil 2.2: Membrana yerleşmiş olan NADH:ubikuinon oksidoredüktazın (kompleks I) şematik gösterimi (Weiss ve diğ., 1991).

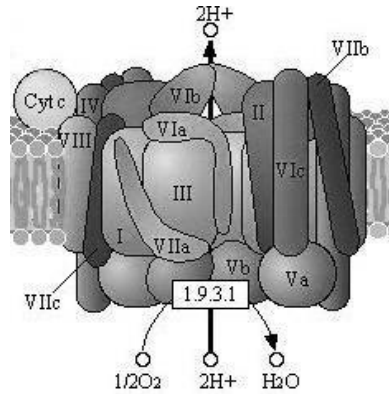
Alt birimlerden sadece birkaç tanesi elektron transferinin gerçekleşmesi için NADH ve ubikuinon substratlarının FMN ve dört adet demir sülfür grubuna bağlanmasında işlevseldir. Demir sülfür grupları taşıyan alt birimler, hidrofilik bölgedeki nad1, nad3 ve nad4 alt birimleri ile kompleksin membranı yatay olarak geçtiği bölgede bulunan nad2 alt birimleridir. Bu alt birimler oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyerek NADH molekülünden kompleks I'e aktarılan elektronların hareketini ve bir sonraki enzime, kompleks III'ye (sitokrom redüktaz), aktarılmasını sağlar (Sackman ve diğ., 1991).

2.4.2. Sitokrom c Oksidaz

Aynı zamanda aa₃ tipi olarak da bilinen sitokrom c oksidaz enzimi ETZ'deki son elektron alıcısıdır. Enzim, moleküler oksijenin suya indirgenmesini protonların

matriksten zarlar arası bölgeye pompalanmasıyla eş zamanlı olarak gerçekleştirilmektedir. *N. crassa* ile yapılan çalışmalar; enzimin nDNA'dan sentezlenen alt birimlerinin mitokondriye taşınarak burada mtDNA'dan sentezlenenlerle bir araya geldiğinde aktivite kazandığını göstermiştir. Sitokrom c oksidaz bakımından delesyonlu *N. crassa* mutantları üzerine yapılan çalışmalar da enzimin katalitik aktivitesinin spor gelişimi için bile mutlak gerekli olduğunu göstermiştir (Stade ve Brambl, 1981).

Heteromultimerik olan enzim 13 farklı alt birimden meydana gelmektedir (Şekil 2.3). Birer Zn ve Mg atomları içeren iki bölgeye ek olarak iki Fe ve iki Cu atomu içeren bölgeye (Fe alt birim a, Fe alt birim a₃, Cu alt birim A ve Cu alt birim B) de sahiptir. Bakterilerle paylaşılan 3 alt birim (COI, COII ve COIII) mitokondride şifrelenirken diğer alt birimler nDNA'dan sentezlendikten sonra mitokondriye taşınmaktadır. Taşınan alt birimlerin işlevleri hala tam olarak bilinmemektedir (Tsukihara ve diğ., 1996).



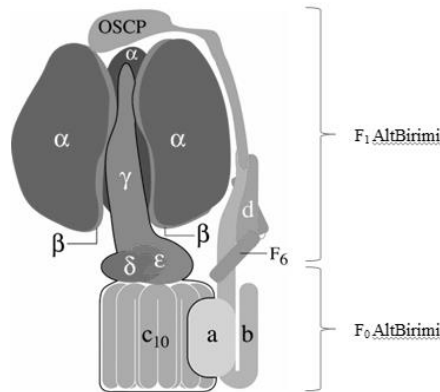
Şekil 2.3: Membranda yerleşmiş olan sitokrom c oksidaz (kompleks IV) ve alt birimlerinin şematik gösterimi (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa00190).

Mitokondride COI ve COII oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarının katalizinden sorumludur. Ancak COIII'ün işlevinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar hala sürdürülmektedir. COIII alt birimi *in vitro* uzaklaştırılmış enzimin elektron taşıyabildiği, diğer alt birimlerindeki (COI ve COII) redoks reaksiyonlarının etkilenmediği, ancak enzimin optimum katalitik aktivite gösterdiği üç boyutlu yapısının değiştiği, ek olarak da COII alt biriminde bulunan Cu_a bölgesinin yapısal olarak bozulduğu gözlenmiştir (Malmström, 1989; Li ve diğ., 1988). Çalışmalar COIII'ün,

enzimin biyosentezi sırasında işlevsel olabileceğini düşündürmektedir. Alt birimin merkezinde taşınan glutamik asit bakiyeleri enzime hidrofobik özellik kazandırmaktadır. Bu nedenle alt birimin enzimin mitokondri membranı üzerinde konumlanmasında ve işlev kazanmasında etkili olabileceği de düşünülmektedir. Ek olarak, COI alt biriminin üç boyutlu yapısını kazanmasında COIII'ün yardımcı olduğu Haltia ve diğ. (1991) tarafından bildirilmiştir.

2.4.3. ATP sentaz

Oksidatif fosforilasyon süreci ile ATP üretiminin son basamağında görevli ATP sentaz çok alt birimli bir iç zar transmembran proteinidir. Proteinin hidrofobik F_0 kompleksi mitokondri membranı üzerinde, hidrofilik F_1 kompleksi ise matrikste bulunmaktadır (Şekil 2.4). Bu yapısal özelliği nedeniyle F_1F_0 ATP sentaz olarak da ifade edilmektedir. F_1 3α , 3β , 1γ , 1δ ve 1ε alt birimlerinden, F_0 ise çok kopyalı c ile birer kopyalı a, b, d, F6 ve OSCP alt birimlerinden oluşmaktadır. Alt birim b, -d, -F6 ve -OSCP F_0 ve F_1 komplekslerini birbirine bağlayan periferik sap olarak iş görmektedir. F_0 kompleksinde bulunan c alt birimlerinin rotasyonu F_1 kompleksindeki merkezi sapın ($\gamma/\delta/\varepsilon$) rotasyonunu teşvik etmektedir. Bu rotasyon sonucu F_1 kompleksinin aktif sitinin üç boyutlu yapısı değişmekte, bunun sonucu olarak da ATP sentezi gerçekleştirilebilmektedir.



Şekil 2.4: F_1F_0 ATP sentaz enzimi ve alt birimlerinin şematik gösterimi (Gledhill ve Walker, 2006).

ATP sentezi için gerekli olan enerji proton (H^+) veya sodyum iyonu (Na^+) gradienti ile sağlanır. F_0 rotor alt birimi elektrokimyasal gradientten sağlanan enerji ile dönerek

protonları membranlar arası alana pompalamaktadır. Zarın iki tarafında oluşan bu proton gradientinden sağlanan enerji ile F_1 alt birimi ATP sentezini gerçekleştirir (Ballamos ve diğ., 2009). *N. crassa*'da enzime ait alt birimleri şifreleyen genlerin nukleus ve mitokondri DNA'sında bulunduğu ve yüksek düzeyde nukleotid çeşitliliği taşıdığı belirlenmiştir. Nukleusda bulunan c alt birimini şifreleyen *Atp9* geninin transkriptlerine vejetatif büyüme sürecinin tamamında rastlanırken mitokondriden kodlanan transkriptler yalnızca spor hücrelerinin gelişimi sırasında sentezlenmektedir (Déquard-Chablet ve diğ., 2011). Çeşitli mantar türlerinde ise enzimi oluşturan alt birimleri şifreleyen genler mtDNA'sı ve nDNA'da olmak üzere iki kopya halinde taşınmaktadır. Örneğin asklı mantarlardan *F. graminearum*'da *atp9* sadece mitokondride kodlanırken *F. oxysporum*, *N. crassa* ve *A. nidulans*'da hem mtDNA'sından hem de nDNA'dan kodlanmaktadır (Hensgens, ve diğ., 1979).

2.4.4. Ribozomal RNA'lar

Mitokondride ribozomun büyük alt birimine ait 23S ile küçük alt birimine ait 12S ve 16S rRNA molekülleri, ökaryotik 28S ve 18S rRNA'lardan boyut ve sekonder yapı bakımından oldukça farklıdır (Gray, 2012). 23S, 12S ve 16S rDNA dizilimleri tüm ökaryotik hücre tiplerinin mitokondrilerinde bulunmaktadır. Bu nedenle hücrelerin evrimsel geçmişlerinin araştırıldığı filogenetik çalışmalarda tercih edilen hedef bölgelerdir. Prokaryotik hücreler ile ökaryotik hücrelerin mitokondrilerinde bulunan 23S rRNA genleri ile yapılan karşılaştırmalı analizler; gen boyunca rastgele serpilmiş ve korunmuş dizilerin bulunduğunu, bu bölgelerin hidrojen bağları sayesinde etkileşime girerek göbek yapılarını oluşturduğunu göstermiştir. Bu açıdan incelendiğinde prokaryotik ve mitokondri rRNA genlerinin benzer sekonder yapıya sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca mantar rRNA moleküllerinin hayvan rRNA'larına oranla daha büyük, bitki rRNA'larına oranla daha kısa olduğu belirlenmiştir. rRNA geni nukleotid içeriğinde yüksek miktarda AT bazları bulunmaktadır. *A.nidulans* büyük alt birim rRNA geni ile *E.coli* 23S rRNA geni arasında yapılan karşılaştırmalı analizler *E.coli* rRNA geninin 5' ucunda bulunan 5.8S ve 3' ucunda bulunan 4.5S benzeri yapının *A.nidulans* rRNA geninde taşınmadığını ortaya koymuştur (Lang ve diğ., 1987).

2.5. MANTARLARDA MİTOKONDRİNİN KALITIMI

Mantarlar aleminde mitokondri kalıtımı hem tek (uniparental) hem de iki ebeveynli (biparental) olabilmektedir. Pek çok ökaryotik hücrede olduğu gibi mantarlarda da çoğunlukla organel DNA'sı tek ebeveynli olarak yavru hücrelere aktarılır. Sitoplazmik (ekstranuklear) kalıtım olarak da ifade edilen organelin kalıtımında karakterler döllere Mendel yasalarına göre aktarılmaz. Mutasyonlu mitokondrilerin paternal olması durumunda tek ebeveynli kalıtım popülasyonda mutant gen frekansının azalmasını sağlar.

Eşeyli üreme gösteren türlerde eşem tipi nDNA'da kodlanan MAT (ing., mating type) lokusu tarafından tayin edilmektedir. Eşem tipleri farklı türlerde a/α , h^+/h^- ve MAT-1/MAT-2 şeklinde gösterilmektedir. MAT lokusları seksüel spor hücrelerinin üretimini başlatacak genel transkripsiyon faktörlerini şifrelemektedir (Kerényi ve diğ., 2004). Genomunda her iki eşem tipine ait MAT lokusunu taşıyan mantarlar homotallik olarak adlandırılır. Homotalliklerde haploid (n) eşem hücreleri aynı bireyin hifleri üzerinde gelişir. Heterotallik mantarlar ise tek bir eşem tipine ait MAT lokusunu taşıdığından eşem hücreleri farklı bireylere ait miseller üzerinde gelişir. Eşleşme farklı eşem tipine sahip hiflerin varlığına bağlıdır. Yavru hücrelerde parental mitokondriler ubiquitinasyonla işaretlenerek elimine edilmekte, yalnız maternal olanlar varlıklarını sürdürmektedir. Ancak yavru hücrelerde ubiquitinle işaretlenemeyen parental mitokondrilerin de döllere aktarılabileceği bilinmektedir (Basse, 2010). Mitokondrilerin hücre içerisinde dinamik bir yapıya sahip olup hem füzyona ve fisyonu uğrayabildikleri asklı mantarlarda gösterilmiştir. Mitokondri dinamiği mtDNA moleküllerinde meydana gelen rekombinasyon mekanizmasından sorumludur.

2.6. FUSARIUM

Fusarium genusu, Ascomycota filumunun, Sordariomycetes sınıfının, Hypocreales takımının Nectriaceae ailesinde yer almakta, patojenik olmayan türlerle birlikte bitki, hayvan ve insanlarda hastalığa yol açan patojenik türleri de içermektedir. *Fusarium* türleri ilk olarak Link (1809) tarafından tanımlanmıştır. Bu türler günümüzde morfolojik ve genetik özellikler temel alınarak sınıflandırılmaktadır (Moretti, 2009).

2.6.1. *Fusarium* spp. ve Mitokondri Genomu

Diğer ökaryotlarda olduğu gibi *Fusarium* spp.'de bir hücre içinde birden fazla mitokondri bulunmakta, organel içinde de çift iplikli DNA moleküllerinden oluşan genom çok kopyalı olarak taşınmaktadır. *F. verticillioides*, *F. solani* ve *F. graminearum* türlerine ait mitokondri genomlarının *in vivo* konformasyonları tam olarak bilinmemektedir. *Fusarium* spp.'de yapılan karşılaştırmalı çalışmalar mtDNA'sından nDNA'sına aktarılan genlerle birlikte gen içeriği ve genom organizasyonunun farklı olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle türler arasında genom boyutu ve taşınan genler değişiklik göstermektedir. Örneğin *F. verticillioides* ve *F. solani*'de mitokondri genomu boyutu sırasıyla 53,7 ve 63.0 bç iken *F. oxysporum* F11 izolatında 34,4 bç gibi küçük bir değer alabilmektedir.

Fusarium spp. arasındaki boyut farklılığını etkileyen en önemli faktör intronlardır. Dizilemesi yapılan dört *Fusarium* türünde *rnl* genindeki grup I intron bölgesi aynı zamanda *rps3* geni olarak bilinmekte ve bağımsız olarak bir protein kodlamaktadır. Ayrıca farklı *Fusarium* spp.'de (*F. verticillioides* 7600, *F. solani* MPVI) *cox1* geni aynı pozisyonda intron bölgesi taşımaktadır. Bu iki durum dışında intronlar *Fusarium* spp. genomunda gelişigüzel dağılır.

Genom boyut farklılığından büyük boyuttaki (7-9 kb) henüz tanımlanamamış ORF'ler (ing., unidentified ORF-uORF) de sorumludur. Bu bölgeler *Fusarium* spp. arasındaki horizontal gen transferlerinin (HGT) ürünleridir (Al-Reedy ve diğ., 2012).

Fusarium mtDNA'sı AT adacıkları bakımından zengindir. Ayrıca genomdaki G+C içeriği %29-32 arasında değişmektedir. GC nukleotidleri intronların dahil olduğu ORF'lerde ve protein kodlayan bölgelerde nadirken uORFlerde sıklıkla bulunmaktadır.

Fusarium spp. mtDNA'larında taşınan ortak genler; apositokrom b'nin, sitokrom oksidaz 1, -2 ve -3 alt birimlerinin, NADH:ubiquinon oksidoredüktaz 1, -2, -3, -4, -4L, -5, -6 alt birimlerinin, ATP sentaz 6, -8 ve -9 alt birimlerinin sentezinden sorumludur. Ayrıca rRNA genleri ortak taşınan genler arasındadır. Genomda bazı genlerin (ribozomun büyük alt biriminin şifrelenmesinden sorumlu *rnl* ve ribozomun küçük alt biriminin yapısına katılan proteinin şifrelenmesinden sorumlu *rps* genleri) mtDNA'daki

pozisyonları birebir aynıdır. Ancak tRNA genlerinin sayısı ve pozisyonlarına ek olarak mtDNA’da taşınan intronların sayısı ve boyutları türler arasında farklı olabilmektedir.

Mitokondri genlerinin transkripsiyonu *Fusarium* spp.’de aynı iplikten gerçekleştirilir. Genler ardışık olarak sıralanırken bir genin bitim kodonu diğer genin başlangıç kodonu ile çakışabilir. Örneğin *nad4L* geninin bitim kodonunun (UAA) son nukleotidi olan A, *nad5* geninin başlangıç kodonunun (AUG) ilk nukleotidini oluşturmaktadır. Genetik koddan sapma *Fusarium* spp.’de de geçerlidir. Örneğin bitim kodonu olan UGA triptofan amino asidinin şifrelenmesinden sorumludur (Al-Reedy ve diğ., 2012).

2.6.2. *Fusarium graminearum*

Yaşam çevriminin büyük bir bölümünde “n” genoma sahip olan *F. graminearum* (teleomorf *Gibberella zeae*) bir bitki patojenidir. Ülkemizde olduğu gibi tüm dünyada gerek bitkilerde ciddi ürün kayıplarına gerekse mikotoksinleri aracılığıyla hayvan ve insanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Homotallik olan mantarda her iki eşem tipine (MAT-1/MAT-2) ait hücreler aynı hif üzerinde gelişmekte, askosporlar (seksüel sporlar) askogonyum ve anteridyumun kaynaşması sonucu oluşan zigottan mayoz bölünmeyle meydana gelmektedir. Hem askosporlar hem de mayoz bölünme geçirmeyen hiflerden gelişen konidyalar (mitosporik hücre) uygun ortamda germinasyonla yeni hifleri oluşturur (Goswami ve Kistler, 2004; Trail, 2009).

F. graminearum 4 adet kromozoma sahiptir. PH-1 (NRRL 31084) izolatının kullanıldığı genom projesi nDNA’nın yaklaşık 36,3541 Mb boyutunda olduğunu göstermiştir (Cuomo ve diğ., 2007). nDNA 13,741 gene sahiptir ve G+C içeriği %48,36’dır. Aynı ırkın 95,68 kb boyutunda mtDNA’sı da dizilenmiş, nukleotid diziliminin 46 ORF’ye karşılık geldiği belirlenmiştir. G+C içeriği ise %31,8 olarak bildirilmektedir (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_009493.1¹). *F. graminearum* mitokondrisinde taşınan genlerden 2’si rRNA, 28’i tRNA, geri kalan 16’sı ise protein kodlanmasından sorumludur. mtDNA’da psödogen rapor edilmemiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/organelles/58>²).

¹ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_009493.1

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/organelles/58>

[Ziyaret Tarihi: 15.04.2015]

[Ziyaret Tarihi: 01.04.2015]

F. graminearum mitokondri genomunun %50'sini intronlar oluşturmaktadır. Genomda taşınan bu intronlar ve introna ait ORF'ler tarandığında biri hariç diğer 12 adet intronun grup I ailesi üyesi olduğu belirlenmiştir. Yapısal ve filogenetik ilişkilendirme çalışmaları bu intronların gruplandırılmalarını sağlamıştır. PH-1'e ait *nad1* geninin 1. intronunun (*nad1* i1) ORF'si bulunmamaktadır. Bu türde intronlar tarafından kodlanan 3 ORF bildirilmiştir: (1) *cob* i2 (ORF227), (2) *cob* i3 ve (3) *cox1* i10. *cob* i2 uORF'sinin (ORF227) şifrelediği polipeptid zinciri daha önce tanımlanmış proteinlerle benzerlik göstermemektedir. *cox1* içerisinde boyutu daha küçük olan bir ORF'nin varlığı da rapor edilmiştir. Bu ORF'nin ürünü de işlevsel değildir (Al-Reedy ve diğ., 2012). Ek olarak, bir ORF de *nad5* ve *cob* genleri arasında bulunmuştur. Bu uORF, *F. proliferatum*'un doğrusal plazmidi (pFP1) tarafından kodlanan B tipi DNA polimeraz nükleotid dizisiyle yüksek benzerlik göstermektedir (Láday ve diğ., 2008). *F. graminearum*'un diğer iki uORF'si tüm *Fusarium* spp.'lerin mtDNA'sında bulunmaktadır. *Fusarium* türleri arasında belirlenmiş en küçük uORF tRNA-arjinin (*trnR*) geninde taşınmaktadır ve 154 amino asitlik polipeptidin sentezinden sorumludur. En uzun protein kodlayan genden yaklaşık 4 kat daha büyük olan en büyük uORF ise *rnl*'nin aşağı bölgesinde yer alır ve ürünü 1931 amino asitlik bir polipeptid zinciridir.

PH-1 mitokondri genomunda 25 bç ve daha büyük boyutta (ortalama $42,8 \pm 28$ bç) olan 51 tekrar bölgesi belirlenmiştir. En büyük doğrudan tekrar bölgesi ORF1931 içinde bulunan 192 bç boyutundaki kısımdır. Genler arasındaki bölgede dağılmış 9 tekrar bölgesi daha bildirilmiştir. Bunlardan biri 64 amino asidin kodlanmasından sorumlu uORF'dir (ORF64). Bu bölge *atp6* geninin 3' ucundaki 256 nükleotidin duplikasyonu ile oluşmuştur. Ayrıca *cox3* geninin 3' ucuna yakın bölgesinde bulunan 105 bç duplikasyonlu tekrar bölgesi, mitokondride taşınan diğer genlerin yakınında bulunmaktadır. Ek olarak, küçük bir doğrudan tekrar bölgesi de *nad4* geninin 3' ucunun yakınında konumlanmıştır (Al-Reedy ve diğ., 2012).

Yedi *Fusarium* spp.'de olduğu gibi *F. graminearum*'da da mitokondride taşınan genler genom projesi ile belirlenmiştir. Bu tür için gerçekleştirilen araştırma projeleri bireyler arasındaki genetik çeşitliliğin ortaya konduğu genotiplendirme ve mikotoksin üretme potansiyellerinin belirlendiği kemotiplendirme çalışmaları üzerinde odaklanmıştır. O'Donnel ve diğ. (2000) nükleusda yer alan tek kopyalı altı genin analizi ile 37 *F.*

graminearum izolatu arasındaki dizi çeşitliliğini ortaya koymuşlar, aynı zamanda tüm kıtalardan sağladıkları izolatları yedi ayrı filocoğrafik soya ayırmışlardır. Láday ve diğ. (2004a) ise bu izolatların bir kısmı (27) ile birlikte toplam 149 bireyin mtDNA'sındaki restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmini (ing., restriction fragment length polymorphism- RFLP) genomik DNA kullanarak araştırmış, farklı soyları ayırt ederek RFLP haplotiplerini oluşturabilmişlerdir. Çalışmada kullandıkları restriksiyon enziminin çeşidine bağlı olarak bireyler arasında yüksek düzeyde varyasyon tespit etmişlerdir. Yli-Mattila ve diğ. (2009) de patojenite, mikotoksin üretme gibi özellikleri ve çoklu lokus DNA dizilemesi temelli genotiplendirme analizini kullanarak 223 izolatu filogenetik olarak birbirinden ayırt edebilmişler, *F. graminearum*'un çok farklı tipte bireyleri içerdiğini göstermişlerdir. nDNA'ya oranla on kat hızlı evrim geçiren mtDNA'nın analizi ile henüz *F. graminearum*'da divergensin ortaya konmasına ve bireylerin alt tür düzeyinde tanımlanmasına yönelik bir çalışma başlatılmamıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. PATOJEN MATERYALİ VE ÜRETİMİ

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında; saflaştırılmış, morfolojik özelliklerine (Booth, 1977; Gerlach ve Nirenberg, 1982) ve moleküler yöntemlere (Yörük ve Albayrak, 2013; Yörük ve diğ., 2014) göre tanımlanmış 47 *F. graminearum* izolatından 14'ü Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan, 31'i İran Isfahan Teknoloji Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden sağlandı. Referans ırklar da Lee ve diğ. (2009) tarafından paylaşıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *Fusarium* izolatları.

İzolat	Tür	Konak	Bölge	İzolat	Tür	Konak	Bölge
F5	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Sakarya	FgT9	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
F6	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Sakarya	FgT10	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
F7	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Sakarya	FgT11	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
F8	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Sakarya	FgT12	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
F9	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Balıkesir	FgT16	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
15F	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Sakarya	Sh2Fgsh1	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
3F	<i>F. graminearum</i>	Mısır	Samsun	Fgsh4	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
5F	<i>F. graminearum</i>	Mısır	Samsun	Fgsh5	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
6F	<i>F. graminearum</i>	Mısır	Samsun	Fgsh7	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
7F	<i>F. graminearum</i>	Mısır	Samsun	Fgsh10	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
14F	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Kastamonu	Fg4	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
1F	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Bolu	Fg18	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Moghon
2F	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Çankırı	Fg56	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Gorgan
4F	<i>F. graminearum</i>	Arpa	Bolu	Fg49	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Moghon
FgM1	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran	Fg170	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Gorgan
FgM3	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran	Fg174	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Gorgan
FgM5	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran	Fg5	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Sarı
FgM6	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran	Fg165	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Kordkooy
FgM7	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran	Sh13	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Bilinmiyor
FgM9	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran	Fgsh14	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Bilinmiyor
FgM10	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran	Fgsh15	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Bilinmiyor
FgT2	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran	H-11	<i>F. graminearum</i>	Mısır	Kore
FgT3	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran	88-1	<i>F. graminearum</i>	Arpa	Kore
FgT7	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran				

Uzun süreli saklamaya alınacak *Fusarium* izolatları SNA (ing., Synthetic Nutrient Agar) besi ortamında üretilirken, moleküler analizler PDA (ing., Potato Dextrose Agar) besi ortamında (Nirenberg, 1976) üretilen izolatlarda gerçekleştirildi (Tablo 3.2). Besi ortamları 121 °C'de 1,2 atm basınç altında 15 dakika steril edildikten sonra 9 cm çapındaki steril petri kaplarına döküldü. Uzun süreli saklamaya alınmak üzere miselyum

parçası steril kürdan yardımıyla içerisinde SNA bulunan petri kabının ortasına koyuldu. İzolatlar iklimlendirme kabininde (WiseCube, Kore) 25 °C, %50 nem değeri ve 6 saatlik gece/gündüz periyodunda 7 gün boyunca üretildi. Süre sonunda steril hava akımlı kabin içerisinde (Nüve, Türkiye) miselyumların üzerine 5 ml %15'lik gliserol eklendi. Miselyumlar steril öze ile süpürülerek toplandı ve 1,5 ml'lik steril mikrotüplerin içerisine alındı. 16 saat boyunca -20 °C'de bekletilen tüpler daha sonra -70 °C'de saklamaya alındı. mtDNA izolasyonunda kullanılacak kültürler de miselyum parçasının steril kürdan ile PDA bulunan petri kabının ortasına konması ile başlatıldı. İzolatlar iklimlendirme kabininde aynı kontrollü koşullar altında 6 gün boyunca üretildi.

Tablo 3.2: *Fusarium* izolatlarının *in vitro* üretiminde kullanılan besi ortamları ve içerikleri, pH 5,6.

Besi ortamı	Bileşenler	Derişim
SNA	KH ₂ PO ₄	1 g/l
	KCl	0,5 g/l
	KNO ₃	1 g/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/l
	Glukoz	0,2 g/l
	Sukroz	0,2 g/l
	Agar	20 g/l
PDA	Patates dekstroz özütü	15 g/l
	Agar	20 g/l

3.2. MTDNA VE GENOMİK DNA İZOLASYONU

Fusarium izolatlarından mtDNA izolasyonu ticari kit (Mitochondrial DNA Isolation Kit; BioVision) kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyonda kullanılmak üzere 20 mg miselyum tartılarak steril bir mikrotüpe aktarıldı. Miselyumların üzerine 1 ml 1x sitosol ekstraksiyon tamponu eklendi ve buzda 10 dakika bekletildi. Süre sonunda tüpler membran parçalayıcıya (Sartorius, Almanya) yerleştirildi. Miselyum 2 dakika boyunca 3000 rpm hızda parçalandı. Parçalama işleminin ardından 4 °C'de 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra üst sıvı yeni bir tüpe alınarak 4 °C'de 10000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüjün ardından üst sıvı uzaklaştırılarak pellet 1 ml 1x sitosol ekstraksiyon tamponu ile suspanse edildi. 4 °C'de 10000 rpm'de 30 dakikalık santrifüj işlemi tekrarlandı. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pellet 30 µl mitokondriyal parçalama tamponunda suspanse edildi. Buzda bekletildikten sonra (10 dakika) tüplere 5 µl enzimB karışımından eklendi ve 50 °C'de sıvı berraklaşmıncaya kadar bekletildi. 100 µl soğuk etanol eklenen tüpler -20

°C’de 10 dakika bekletildi. Süre sonunda oda sıcaklığında 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra DNA pelleti 30 µl steril saf suda çözdürüldü.

Genomik DNA CTAB yöntemine göre izole edildi (Doyle ve Doyle, 1987). Parçalama için 50 mg taze ağırlığa sahip miselyum sıvı azot ile toz hale getirildi ve 500 µl CTAB (2X) tamponu eklenerek işleme devam edildi. Sıvı homojenat 1.5 ml’lik mikrotüplere aktarıldıktan sonra üstüne 350 µl LiCl (8M) eklendi ve tüpler birkaç kez karıştırıldı. Örneklere 10 µl (10 mg/ml) RNazA eklenerek 37°C’de 30 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra tüplere 700 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi ve örnekler karıştırıldı. 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı yeni mikrotüpe aktarıldı. Eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1) ilave edilen tüpler yine karıştırıldı. Tekrar 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı yeni mikrotüpe aktarıldıktan sonra 1/10 hacimde NaOAC (3M) ve 2 hacim soğuk etanol eklendi. Tüpler yavaşça karıştırıldı. Örnekler 70°C’de 30 dakika bekletildi ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj sonrası üst sıvı döküldü. Tüpler 2 kere %70 etanolle yıkandı ve kurutma işlemi sonrasında DNA 50 µl distile suda çözdürüldü.

3.3. DNA MOLEKÜLLERİNİN NİTEL VE NİCEL ANALİZİ

İzolasyonu yapılan genomik DNA ve mtDNA moleküllerinin nitel analizinde jel elektroforezi kullanıldı. Bu amaçla %1’lik agaroz jel hazırlandı. Toplam 40 ml’lik jel için 0,4 gr agaroz tartılarak 40 ml tris-asetat (TAE) tamponu (Tablo 3.3) içerisinde çözdürüldü. Soğutulan süspansiyona etidyum bromür (10mg/ml) eklendi ve karıştırıldı. Kaset içerisine dökülen jelin polimerize olması beklendi. İzole edilen mtDNA molekülleri 6X yükleme boyası ile karıştırılarak polimerize olan jele ait kuyucuklara yüklendi. Elektroforez 70 Volt sabit güç altında 30 dakika süre ile gerçekleştirildi.

Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlara ait bileşenler ve derişimleri.

Tampon	Bileşenler	Derişim
TAE	Tris bazı	2 M
	Glisyal asetik asit	% 0,0571
	EDTA (pH 8.0)	0,05 M
	Tris-HCl (pH 7.6)	10mM
Elektroforez yükleme tamponu (6X)	Bromofenol mavisi	% 0.03
	Xylene siyanol FF	% 0.03
	Gliserol	% 60
	EDTA	60 mM

DNA moleküllerinin miktar ve saflık tayini çok kuyucuklu plaka spektrometre (μ Quant, ABD) cihazında yapılan ölçümlerle gerçekleştirildi. Plakadan geçirilen 260 ve 280 nm dalga boyundaki UV ışıkta boş okuma yapıldı. Analizde kullanılmak üzere steril saf suda çözdürülen DNA 200'lük sulandırım yapılarak kuyucuğa uygulandı. Kör örnek olarak saf su kullanıldı. Kuyulara yüklenen örneklerin 260 ve 280 nm dalga boyundaki UV ışığını emme değerleri ölçüldü. Örneklerle ait ışık yolu uzunluğu değerleri dikkate alınarak DNA miktarı ($\mu\text{g/ml}$) " $A_{260} \times \text{sulandırım katsayısı} \times 50$ " formülüne göre hesaplandı. DNA saflığı 260 ve 280 nm dalga boyundaki emme değerlerinin oranına (A_{260}/A_{280}) göre kontrol edildi. Bu oran 1,8-2,0 değer aralığında ise DNA'nın saf olduğu kabul edilir (Maniatis ve diğ., 1982).

3.4.FUSARIUM TÜRLERİNDE MİTOKONDİRİ GEN İÇERİĞİ VE ORGANİZASYONUNUN ÇOKLU HİZALAMASI

F. graminearum DQ_364632.1 ve NC_009493.1, *F. fujikuroi* JX10420.1 ve *F. oxysporum* AY945289.1 aksesyon numaralı mitokondri genomlarına ait genlerin nukleotid dizilimleri NCBI (ing., National Center of Biotechnology Information) veritabanından ayrı ayrı görüntülendi. Bu amaçla konu başlığı olarak "nukleotid" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>³) sekmesi seçildi. Arama çubuğuna "*Fusarium* sp. mitokondri" anahtar kelimeleri yazılarak tarama gerçekleştirildi. Anahtar kelime ile ilişkili bağlantıları içeren pencere aktif hale getirildi. Taranan aksesyon numaralarına ulaşıldığında her birine ait genom bilgilerini içeren bağlantılardan mitokondri genlerine genlere ait dizilim bilgilerine erişildi. Bunlar arasından ATP sentaz alt birim 9 (*atp9*), NADH:ubikuinon oksidoredüktaz alt birim 2 (*nad2*) ve sitokrom oksidaz alt birim 3 (*cox3*) genleri enerji metabolizmasından sorumlu elektron taşıma sisteminin bileşenleri olduğu ve birçok ökaryotik hücre tipinde ortak olarak taşındığı için; büyük alt birim ribozomal RNA (*rnl*) geni ise translyasyonda görevli ribozomların yapısına katıldığı ve filogenetik çalışmalarda tercih edildiği için seçildi.

Her bir gen için sekiz *Fusarium* izolatına ait dizilim bilgileri çevrimiçi hizmet veren "CLUSTALW" (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>⁴) programıyla hizalama analizine tabi tutuldu. Bu amaçla analiz edilecek dizi bilgisi "DNA" olarak seçildi. Her bir gene ait nukleotid dizisi FASTA formatına çevrildi ve satır atlanarak ardışık olarak

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

⁴ <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>

[Ziyaret Tarihi: 10.10.2014]

[Ziyaret Tarihi: 10.10.2014]

veri giriş penceresine yapıştırıldı. Çoklu karşılaştırma seçeneği tıklandı ve hizalamalar 60 nukleotidlik DNA parçaları şeklinde görüntüledi. Elde edilen hizalamalarda identik bölgeler yıldız işaretiyle (*) vurgulanırken uyum yakalanamamış bölgelerle birlikte delesyonlu bölgeler yatay çizgi (-) ile gösterildi.

3.5. PRİMER TASARIMI

Her bir genin PZR ile çoğaltımında kullanılacak oligonukleotid primerler, hizalamaları yapılan bölgeler esas alınarak tasarlandı. Bu amaçla hizalamalar sonucu elde edilen identik nukleotidlerin bulunduğu bölgeler seçildi. Sekiz izolatta ortak taşındığı belirlenen bölgenin baş ve son kısımlarına tamamlayıcı özellikte olacak şekilde yaklaşık 21 nukleotidlik iki oligonukleotid tasarlandı. Çoğaltılacak bölgede ileri primer görevi üstlenecek oligonukleotid doğrudan kullanılırken identik bölgenin sonundan seçilen oligonukleotid dizisi “Reverse Complement” programındaki (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html⁵) veri giriş penceresine FASTA formatında yapıştırıldı. “Submit” komutu ile oligonukleotid dizisinin tamamlayıcı ters ipliği oluşturuldu. Tasarlanan ileri ve geri primerin PZR’de kullanılabilirliği “OligoAnalyser” (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>⁶) programında test edildi. Oligonukleotid dizileri veri penceresine yapıştırılarak dizilerin self-dimer, hetero-dimer ve saç tokası oluşturma olasılıkları ayrı ayrı ΔG değerinin metamatiksel olarak hesaplanmasıyla belirlendi. ΔG değerleri -6 ile 2 (kcal/mol) arasında olan oligonukleotidler PZR’de kullanılmak üzere seçildi. Seçilen bu primer moleküllerinin nuklear DNA’da olası bağlanma bölgelerinin varlığı da NCBI Primer “BLAST” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>⁷) programı ile tarandı. Bu amaçla ileri ve geri oligonukleotid dizileri programdaki veri kutusuna FASTA formatı ile girildi. Primer çiftlerinin özgünlüklerinin kontrol parametreleri bilgi ekranında kromozomal DNA ve *F. graminearum* PH-1 (Takson 229533) olarak seçildi. *F. graminearum* nDNA’sı üzerinde tanıma bölgesi bulunmayan oligonukleotidler primer molekülü olarak kullanılmak üzere hizmet alımı ile IDT firması tarafından sentezlendi.

⁵ http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

⁶ <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

⁷ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

[Ziyaret Tarihi: 10.10.2014]

[Ziyaret Tarihi: 11.10.2014]

[Ziyaret Tarihi: 15.10.2014]

3.6. GENLERİN PZR İLE ÇOĞALTIMI

3.6.1. Mitokondri Genlerinin Çoğaltımı

PZR reaksiyonunda 50 ng mtDNA'sı, 1X PZR tamponu, 1,5 mM Mg₂Cl, 0,08 mM dNTP karışımı, 10 pmol ileri ve geri primer, 0,04 U/μl Taq DNA polimeraz enzimi 25 μl hacimde karıştırıldı. PZR koşulları *nad2*, *cox3* ve *rnl* genlerinin çoğaltımı için 94°C'de 2 dakikalık bir ön denatürasyonu takiben 4 döngülük 94°C'de 1,5 dakika, 50-44°C'de 1,5 dakika ve 72°C'de 3 dakika ve 30 döngülük 94°C'de 1 dakika, 50-44°C'de 1 dakika ve 72°C'de 2 dakikanın ardından 72°C'de 10 dakikalık final uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. *atp9* geninin çoğaltımı ise 94°C'de 2 dakikalık bir ön denatürasyonu takiben 94 °C'de 1 dakika, 52°C'de 1 dakika ve 72°C'de 2 dakikanın ardından 72°C'de 10 dakikalık final uzama olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.6.2. MAT Genlerinin Genomik DNA'dan Çoğaltımı

F. graminearum nuklear genomunda taşınan *MAT1* and *MAT2* genlerinin çoğaltımında Kerényi ve diğ. (2004) geliştirdiği primer çiftleri (Tablo 3.4) kullanıldı.

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan özgün primer dizileri.

Gen	Primer	Dizisi 5'-3'	Ürün Boyutu (bp)
<i>MAT1</i>	İleri	CGCCCTCTKAAYGSCTTCATG	210
	Geri	GGARTARACYTTAGCAATYAGGGC	
<i>MAT2</i>	İleri	CGACCTCCCAAYGACYTACAT	260
	Geri	TGGGCGGTACTGGTARTCRGG	

25 μl'de gerçekleştirilen PZR'da 1X PZR tamponu, 50 ng nDNA, 10 pmol ileri ve geri primer, 0,08 mM dNTP karışımı, 2 mM MgCl₂ ve 0,04 U/μl of Taq polimeraz kullanıldı. PZR işlemi 94 °C'de 2 dakikalık ön denatürasyonu takiben 30 döngüden oluşan 94 °C'de 1 dakika, 56-57 C°'de 1 dakika ve 72 °C'de 1 dakika olarak gerçekleştirildi. Final uzama 72°C'de 3 dakika olarak gerçekleştirildi.

3.7. PZR ÜRÜNLERİNİN AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ İLE ANALİZİ

Özgün primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile bölüm 3.3'te ayrıntılandırıldığı gibi analiz edildi. Jel hacmine uygun olarak tartılan agaroz TAE tamponu içerisinde çözdürüldü ardından etidyum bromür eklenerek jel kasetine döküldü. Çoğaltım ürünleri 1 kb boyut markırı (Thermo A.B.D) ile birlikte jele uygulanarak 70 V sabit güç altında 40 dakika boyunca yürütüldü. Elektroforez sonrası

çoğaltım ürünleri jel görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflandı (Avegene, X-lite 200, Türkiye).

3.8. PZR ÜRÜNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Özgün genlere ait 50 µl'de çoğaltılan PZR ürünleri saflaştırma amacıyla *E. coli* DH5α ırkında ticari kit (Promega p-GEMT easy vektör sistemi) kullanılarak klonlandı.

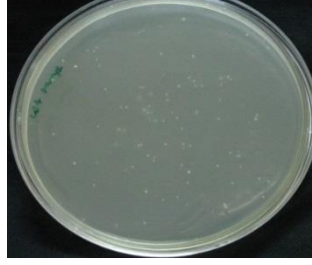
3.8.1. Bakteri Üretimi ve Transformasyona Yeterli Hücre Hazırlığı

Transformasyon işleminde kullanılacak *E. coli* DH5α hücre kültürleri LB (ing., Luria Bertani) besi ortamında (10 g/l Tripton, 5 g/l Yeast Ekstraktı, 5 g/l NaCl) 37°C'de, 180 rpm'de 16 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde üretildi. Kültürdeki hücre yoğunluğu 30 dakikada bir 600 nm dalga boyundaki UV ışığı emme değeri ölçülerek hesaplandı. OD₆₀₀ değeri 0,3-0,4 aralığında olduğunda kültürleme işlemi sonlandırıldı. 10 dakika buzda bekletilen kültür 4°C'de 7000 rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi. Hücreler transformasyona CaCl₂ yöntemi ile (Cohen ve diğ., 1972) yeterli hale getirildi. Bu amaçla pellet üzerine 10 ml CaCl₂ (0,1 M) eklendi. Ardından çözelti 30 dakika buzda bekletildi. 4°C'de 7000 rpm'de, 3 dakika olarak gerçekleştirilen santrifüjden sonra pellet 2 ml 0,1 M CaCl₂ ile süspanse edildi.

3.8.2. Çoğaltım Ürünlerinin Vektöre Bağlanması, Transformasyon ve Seleksiyon

Dizileme hizmeti alınacak PZR ürünlerinin eldesi için 3.6.1'de ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde yüksek hacimde çoğaltım yapıldı. PZR ürünlerinin "pGEMT easy" vektörü ile ligasyon işlemi final konsantrasyonları 75 ng plazmid, 1X ligasyon tamponu, 150 ng PZR ürünü ve 10 U T4 DNA ligaz enzimi olacak şekilde toplam 20 µl hacimde bir araya getirildikten sonra oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi. Çoğaltım ürünlerini taşıyan plazmidler *E.coli* DH5α hücrelerinde transformasyon yöntemi ile klonlandı. Bu amaçla ligasyon karışımının 2 µl'si hazırlanan yeterli hücre solüsyonunun 50 µl'sine eklendi. Hafifçe karıştırılan tüpler 20 dakika buzda bekletildi, süre sonunda 50 saniye 42°C'de ısı şokuna maruz bırakılan tüpler 2 dakika için buza alındı. Oda sıcaklığındaki SOC (Trypton 20g/l, Maya Ekstresi 5g/l, NaCl 0,5g/l, KCl 250 mM, MgCl₂ 2M, Gliserol %20) besi ortamından 950 µl eklenen tüpler 37°C'de 150 rpm hızdaki çalkalayıcıda 1,5 saat süre ile inkübe ederek transformasyon gerçekleştirildi. Olası transformantları içeren kültürün 200 µl'si LB-Amp-IPTG-XGal besi ortamına yayma ekim yöntemi ile ekildi. Bir gece 37°C'de inkübasyondan sonra

beyaz-mavi koloni gözlemi yapıldı. Plazmid moleküllerini içeren beyaz koloniler seçildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: *E. coli* DH5 α ırkında transformasyon sonucunda elde edilen beyaz ve mavi koloniler.

Seçilen beyaz tekli kolonilerden M13pUCF (3'AGTCACGACGTTGTAAAACG 5') ve M13pUCR (3' CGGATAACAATTCACACAGG 5') primer çifti kullanılarak koloni PZR'u gerçekleştirildi. Bu amaçla; PZR bileşenleri; 1X PZR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP karışımı, 5'er pmol primer çifti ve 0,04 U/ μ l Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde bir araya getirildi. 94°C'de 2 dakikalık ön denatürasyonu takiben PZR; 30 tekrardan oluşan 94°C'de 30 saniye, 45°C'de 30 saniye ve 72°C'de 1 dakika kademeleri ile tamamlandı. Olası transformantların, taşıdığı rekombinant plazmidlerin taraması koloni PZR ile yapıldığında PZR ürün boyutu+230 bç'lik çoğaltım ürünü elde edildi.

3.8.3. Plazmid İzolasyonu

Koloni PZR ile transformant olduğu belirlenen tek kolonilerden kürdanla alınan örnek 50 μ g/ml ampisilin içeren LB besi ortamına ekilerek 16 saat boyunca üretildi. Mitokondri genlerinin çoğaltım ürünlerini taşıyan plazmid DNA'sı *E. coli* DH5 α suşundan izole edildi. Bu amaçla ampisilin (50mg/ml) içeren LB'de 37°C'de, 150 rpm hızındaki çalkalayıcıda gece boyunca üretilen bakteri hücreleri 7000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilerek toplandı. 100 μ l soğuk lizis tamponu (5 mM glukoz, 25 mM HCl, 10 mM EDTA; pH 8,00) ile süspansiyon haline getirilen karışım üzerine 200 μ l alkali SDS solüsyonu (0,2 N NaOH, %1 SDS) eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek hücrelerin parçalanması ve nDNA'nın denatürasyonu sağlandı. Parçalanmış hücrelerin üzerine 15 μ l RNazA (10 mg/ml) eklenerek 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyon gerçekleştirildi. Süre sonunda lizat üzerine 4°C'de soğutulmuş 150 μ l 5M potasyum asetat eklendi ve tüp 30 dakika buz içerisinde bekletildi. 13000 rpm'de 10

dakika santrifüj yapılarak ve üst sıvı temiz tüpe alındı. Üzerine 1 ml saf etanol eklenen tüpler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Santrifüj işemi oda sıcaklığında 13000 rpm hızda 20 dakika süre ile yapılarak plazmid DNA'sı çöktürüldü. Plazmid DNA'sı steril saf su ile çözdürüldü. Agaroz jel (%1) elektroforezinde yüksek yüksek kalite ve miktarda (1-3µg/µl) olduğu belirlenen plazmidler taşıdıkları genlerin dizilenmesi için seçildi.

3.9. DİZİLEME YÖNTEMİNE DAYALI VERİ ANALİZİ

Saflaştırılan PZR ürünlerine ait çift yönlü dizilim bilgisi “Sanger Metodu”na göre REFGEN A.Ş. tarafından gerçekleştirildi. Geri dizinin ters tamamlayıcı dizisi ile ileri diziye ait nukleotid dizilimi “Chromas Lite” programı ile FASTA formatına dönüştürüldü. İleri ve geri dizilim bilgileri ile birlikte NCBI nukleotid veritabanından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>⁸) sağlanan *F. graminearum* NC_009493.1 referans ırkına ait gen dizilimi FASTA formatında alındı ve “CLUSTALW” programı (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>¹⁰) ile 3.4 alt başlığında belirtildiği gibi hizalandı. Referans ırkalara ait dizilim bilgisiyle uyum gösteren ileri ve/veya geri diziye ait bölgeler izolatlar arasında yapılacak hizalama analizleri için seçildi. 47 izolata ait nukleotid dizilimleri referans ırka ait dizi bilgileri ile birlikte “CLUSTALW” programı kullanılarak hizalandı. Hizalama sonucunda “neighbor-joining” (NJ) algoritması temel alınarak bireyler arasındaki benzerlik oranları ortaya kondu. Elde edilen sonuçlar MEGA6 programı ile maksimum olabilirlik (ing., maximum likelihood-ML) ve maksimum sıklık (ing., maximum parsimony-MP) metodları ile değerlendirildi (Tamura ve diğ., 2013). Her bir gen için filogenetik ağaçlar hizalama sonuçları temel alınarak oluşturuldu ve kladogram halinde sunuldu. Bu amaçla FASTA formatında alınan hizalama sonuçları MEGA6 programında “meg” formatına dönüştürüldü. Ardından programa ait “phylogeny” sekmesinden “Construct/Test Maximum Parsimony Tree” veya “Construct/Test Maximum Likelihood Tree” sekmesine tıklanarak filogenetik ağaçlar oluşturuldu. Her bir izolat için gen bölgesinde saptanan nukleotid varyasyonlarının ORF’de yol açtığı değişim dizilim bilgilerinin NCBI-ORF TARAMA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>¹¹) programında analiz edilmesiyle

⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>

[Ziyaret Tarihi: 15.04.2015]

⁹ <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>

[Ziyaret Tarihi: 16.04.2015]

¹⁰ <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>

[Ziyaret Tarihi: 16.04.2015]

¹¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>

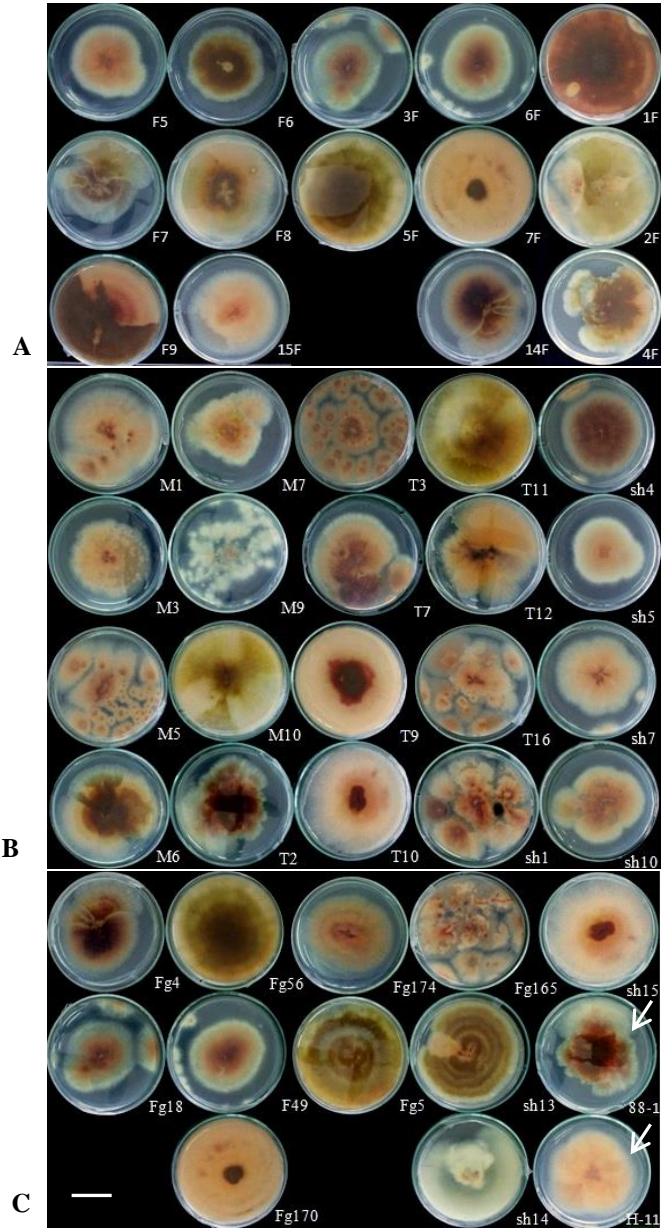
[Ziyaret Tarihi: 20.04.2015]

belirlendi. Bu amaçla referans ırk da dahil olmak üzere her seferinde bir bireye ait dizi bilgisi FASTA formatında veri giriş penceresine yapıştırıldı. “OrfFind” komutu ile olası okuma çerçeveleri belirlendi. Referans ırkla uyum gösteren bölgelere ait amino asit dizileri alınarak CLUSTALW programı ile hizalandı ve BLASTP ile okuma çerçevesindeki amino asit değişimleri karşılaştırılarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. PATOJEN ÜRETİMİ

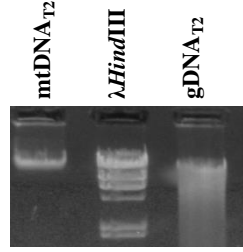
Yüksek lisans tez projesi kapsamında kullanılacak 47 *F. graminearum* izolatının 6 gün boyunca PDA besi ortamında üretilen *in vitro* kültürleri Şekil 4.1’de verilmektedir.



Şekil 4.1: 14’ü Türkiye’de (A), 31’i İran’da (B ve C) hastalık oluşturan *F. graminearum* izolatlarıyla birlikte 2 referans ırkın (beyaz oklarla gösterilmiştir) PDA besi ortamındaki 6 günlük *in vitro* kültürleri.
Bar: 3 cm

4.2. GENOMİK DNA VE MTDNA ANALİZ SONUÇLARI

47 adet *F. graminearum* izolatının 20 mg yaş ağırlığındaki miselyumlarından izole edilen mtDNA'larının 260 nm'deki absorpsanları 0,136-0,664 değer aralığında ölçüldü. mtDNA miktarı, 1300-270 ng/μl olarak hesaplandı. Tüm izolatlara ait saflık değerleri (OD₂₆₀/OD₂₈₀) 1,5-1,8 aralığında idi. 50 mg yaş ağırlığındaki miselyumlardan izole edilen, 260 nm'deki absorpsan değerleri 0,25-0,70 arasında belirlenen genomik DNA'ların miktarları 1400-500 ng/μl olarak hesaplandı. Genomik DNA'lara ait saflık değerlerinin de referans aralığında olduğu (1,8-1,9) görüldü. İzole edilen mtDNA'sı ile genomik DNA'lar agaroz jelde kontrol edildi ve farklı göç profillerine sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: *F. graminearum* T2 izolatının mtDNA ve genomik DNA'sının agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Standart DNA: λ HindIII (Thermo, ABD).

4.3. GENLERİN REFERANS IRKLARDA ÇOKLU HİZALAMA SONUÇLARI VE TASARLANAN PRİMERLER

F. graminearum 'a ait iki referans ırka ek olarak iki *Fusarium* türüne (*F. fujikuroi*, *F. oxysporum*) ait *nad2*, *cox3*, *atp9* ve *rnl* genlerinin dizilimleri NCBI veritabanından görüntülendi. Herbir gen için nukleotid dizilimleri CLUSTALW programı kullanılarak ayrı ayrı çoklu hizalandı. Gen dizileri karşılaştırıldığında dizi benzerliği gösteren bölgeler "*" işareti ile gösterildi. Delesyon bölgelerinin yer almadığı, homolojinin yüksek olduğu dizilimler 47 izolatta PZR ile çoğaltılacak hedef bölgeler olarak seçildi. PZR'de kullanılacak olan primer moleküllerinin tasarımında bu hedef bölgelerin sınırları temel alındı. *cox3* geninin dört referans ırkta çoklu hizalandığı karşılaştırma analiz sonuçları kısmi olarak Şekil 4.3'te verilmektedir. *cox3* geni için primer tasarlanan bölgeler kutu (□) içerisine alınarak gösterilmiştir.

NC_009493	<u>GTGCATTAACACCTACTGTAGA</u> TTAGGAGCTCAATGACCACCTATGGGTATAGAACCTG
DQ364632	GTGCATTAACACCTACTGTAGAATTAGGAGCTCAATGACCACCTATGGGTATAGAACCTG
JX910420	GTGCATTAACACCTACTGTAGAATTAGGAGCTCAATGACCACCTATGGGTATAGAACCTG
AY945289	GTGCATTAACACCTACTGTAGAATTAGGAGCTCAATGACCACCTATGGGTATAGAACCTG *****
NC_009493	TAAACCCGTTTGAATTACCATTACTTAATACAGTAATTTTATTATCTAGTGGAGCAACTA
DQ364632	TAAACCCGTTTGAATTACCATTACTTAATACAGTAATTTTATTATCTAGTGGAGCAACTA
JX910420	TAAACCCGTTTGAATTACCATTACTTAATACAGTAATTTTATTATCTAGTGGAGCAACTA
AY945289	TAAACCCGTTTGAATTACCATTACTTAATACAGTAATTTTATTATCTAGTGGAGCAACTA *****
NC_009493	TTACTTATGCGCACCACTCATTAAATAAAGGAGAAAGAAAAGGAGCTTTATATGGTTCTA
DQ364632	TTACTTATGCGCACCACTCATTAAATAAAGGAGAAAGAAAAGGAGCTTTATATGGTTCTA
JX910420	TTACTTATGCGCACCACTCATTAAATAAAGGAGAAAGAAAAGGAGCTTTATATGGTTCTA
AY945289	TTACTTATGCGCACCACTCATTAAATAAAGGAGAAAGAAAAGGAGCTTTATATGGTTCTA *****
NC_009493	TCTTTACAGTTCATTAGCTTTAATATTCACCTTTCTTTCAAGGGGTAGAATATAGCGTTT
DQ364632	TCTTTACAGTTCATTAGCTTTAATATTCACCTTTCTTTCAAGGGGTAGAATATAGCGTTT
JX910420	TCTTTACAGTTCATTAGCTTTAATATTCACCTTTCTTTCAAGGGGTAGAATATAGCGTTT
AY945289	TCTTTACAGTTCATTAGCTTTAATATTCACCTTTCTTTCAAGGGGTAGAATATAGCGTTT *****
NC_009493	CTTCATTTACTATTAGTGACGGTGTATTTGGTACATGTTCTTCTTCGGTACGGGTTCC
DQ364632	CTTCATTTACTATTAGTGACGGTGTATTTGGTACATGTTCTTCTTCGGTACGGGTTCC
JX910420	CTTCATTTACTATTAGTGACGGTGTATTTGGTACATGTTCTTCTTCGGTACGGGTTCC
AY945289	CTTCATTTACTATTAGTGACGGTGTATTTGGTACATGTTCTTCTTCGGTACGGGTTCC ****
NC_009493	ATGGCTTCCACGTTATTATAGGTACAATATTCCTTATCAGTGGCTTTATGAAGAATATATT
DQ364632	ATGGCTTCCACGTTATTATAGGTACAATATTCCTTATCAGTGGCTTTATGAAGAATATATT
JX910420	ATGGCTTCCACGTTATTATAGGTACAATATTCCTTATCAGTGGCTTTATGAAGAATATATT
AY945289	ATGGCTTCCACGTTATTATAGGTACAATATTCCTTATCAGTGGCTTTATGAAGAATATATT * * * *
NC_009493	CATACCATTTAACAGACCATCATCATCTGGTTATGAAGCTGGAATATTATATTGACATT
DQ364632	CATACCATTTAACAGACCATCATCATCTGGTTATGAAGCTGGAATATTATATTGACATT
JX910420	CATACCATTTAACAGACCATCATCATCTGGTTATGAAGCTGGAATATTATATTGACATT
AY945289	CATACCATTTAACAGACCATCATCATCTGGTTATGAAGCTGGAATATTATATTGACATT *****
NC_009493	TTGTAGATGTAGTTGACTATTCCTATACGTAACA <u>ATGTATTACTGAGGAAGTTAG</u>
DQ364632	TTGTAGATGTAGTTGACTATTCCTATACGTAACAATGTATTACTGAGGAAGTTAG
JX910420	TCGTGGATGTAGTTGACTTTTCTTATATGTATCTATGTATTATTGAGGTTCTTAA
AY945289	TCGTGGATGTAGTTGACTTTTCTTATATGTATCTATGTATTATTGAGGTTCTTAA * * * *

Şekil 4.3: *F. graminearum*'a ait iki referans ırka (ACNo: NC_009493 ve DQ_364632), *F. fujikuroi* (AC No: JX_910420) ve *F. oxysporum* (AC No: AY_945289) referanslarına ait *cox3* geni nukleotid diziliminin çoklu hizalaması ile yapılan karşılaştırma analiz sonuçları. * benzer olan nukleotid dizilerini, □ primer sentezi için seçilen nukleotid dizilerini göstermektedir.

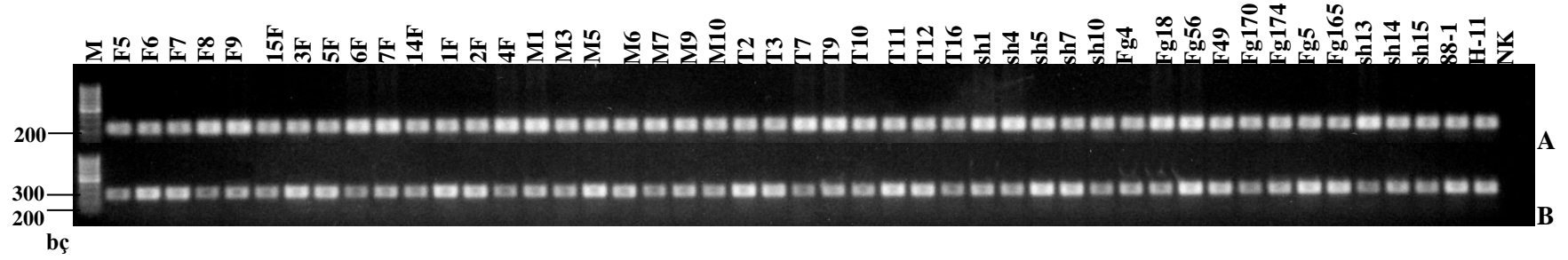
Tez kapsamında çoklu hizalamaları gerçekleştirilen dört gen için belirlenen bölgelere özgün, sekiz adet 20-23 bazlık oligonukleotid primer tasarlandı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve nukleotid dizilimleri.

Gen	Primer	Primer Dizisi 5'-3'	Ürün Boyutu (bp)
<i>atp9</i>	İleri	GAGGGTGAATTGCAAAGAGG	603
	Geri	TCGATTCATTTTTGTTTCACATTT	
<i>cox3</i>	İleri	AAGTTTAATACAAACTTTGAA	527
	Geri	GTGCATTAACACCTACTGTAGAA	
<i>rnl</i>	İleri	ACGTAGTTAAACCGAGCGTTA	1547
	Geri	TCCTAAACCAATTCATTCATA	
<i>nad2</i>	İleri	ATAGCCAACCTGCGTCAGGAT	5192
	Geri	TAAGAAGGGGGCGAAGCTAT	

4.4. UNİPARENTAL KALITIMIN *MAT* GENLERİNİN ÇOĞALTIMI İLE GÖSTERİMİ

47 adet *F. graminearum* izolatında *MAT-1* ve *MAT-2* idiomorflarının korunmuş domenleri, nukleotid dizilimleri Tablo 3.4'te verilen oligonukleotid çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. *MAT-1* idiomorfunun 210 bp boyutundaki α -kutu (α -box) domeni tüm örneklerden elde edildi (Şekil 4.4.A). Benzer şekilde *MAT-2* idiomorfunun 260 bp boyutundaki HMG (ing., high mobility group) kutu domeni de 47 izolatta çoğaltıldı (Şekil 4.4.B). Elde edilen veriler referans 2 ırkla birlikte 47 *F. graminearum* izolatının her iki idiomorfunun da genomunda taşıdığını, izolatların homotallik olduğunu ve sonuç olarak uniparental kalıtımı gösterdiklerini ortaya koydu.



Şekil 4.4: *45F.graminearum* izolatu ve 2 referans ırkda idiomorfik allerlerden (A) *MAT 1*'e ait 210 bç'lik çoğaltım ürünlerinin, (B) *MAT 2*'ye ait 260 bç'lik PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 100 bç'lik standart DNA (Thermo ABD), NK: Negatif kontrol.

4.5. MİTOKONDİRİ GENLERİNİN ÇOĞALTIMI VE SAFLAŞTIRILMASI

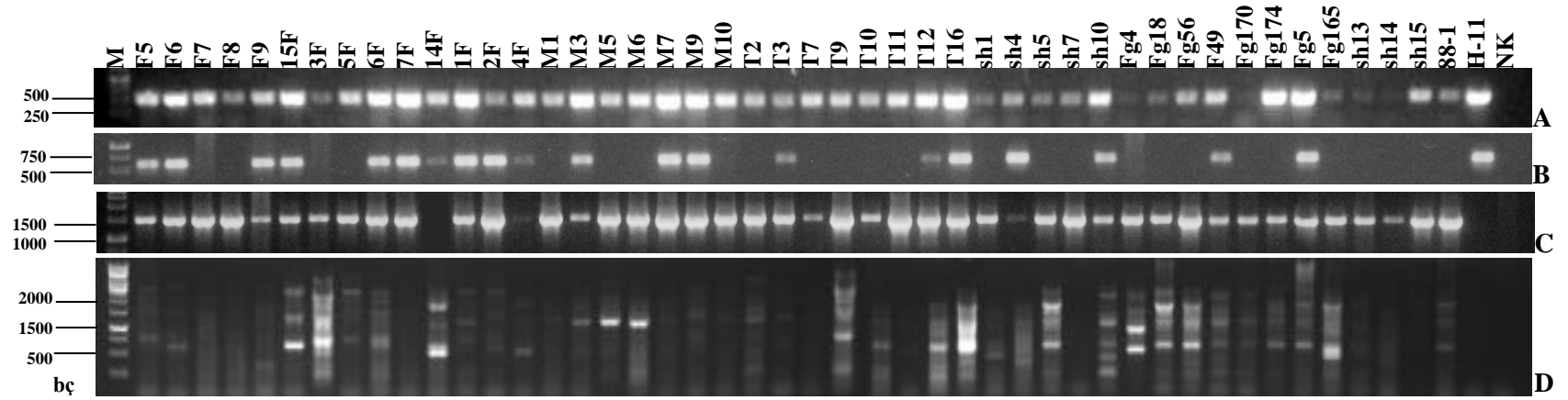
cox3, *atp9*, *rnl* ve *nad2* genleri 47 izolatta Tablo 4.1'de nukleotid dizilimleri verilen primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı ve pGEMTeasy vektör sistemi kullanılarak saflaştırıldı.

cox3 geni PZR ile çoğaltıldığında Fg170 izolatu hariç tüm izolatlar ve iki referans ırkta 527 bç boyutundaki bölge elde edildi (Şekil 4.5.A). sh5, Fg4 ve sh14 izolatlarında saflaştırma sonucunda elde edilen ürünün dizileme reaksiyonu için yeterli olmadığı görüldü. Sonuç olarak 43 izolata ait *cox3* geni çoğaltım ürünleri PGEMTeasy vektör sistemi ile saflaştırıldı.

atp9 geni ise 21 izolatta (F5, F6, F9, 15F, 6F, 7F, 14F, 1F, 2F, 4F, M3, M7, M9, T3, T12, T16, sh4, sh10, F49, Fg5, H-11) çoğaltıldı. Beklenen 603 bç boyutundaki ürünler agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Şekil 4.5.B). 14F, 4F ve T12 izolatları hariç 18 izolattan çoğaltım ürünleri saflaştırıldı.

rnl genine ait 1547 bç'lik PZR ürünleri 14F ve H-11 hariç 45 izolattan elde edildi (Şekil 4.5.C). 3 izolat (4F, sh4, sh14) yetersiz ürün eldesi nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Transformasyonda kullanılmak üzere, yüksek miktarda ürün sağlamak için tekrarlanan PZR analizlerinde ise 12 izolattan (M3, M7, T9, T10, T11, sh1, sh7, Fg56, F49, Fg170, Fg165, sh13) yetersiz ürün elde edildi. Sonuç olarak saflaştırılmış *rnl* genini taşıyan plazmidler 30 izolattan sağlandı.

NADH:ubiquinon oksidoredüktazın alt birim II'sini kodlayan gen (*nad2*) bölgesi PZR ile çoğaltıldı. 3 izolatta (7F, sh15, H-11) çoğaltım sağlanamadı. Yetersiz ürün eldesi 25 izolatta gözlemlendi. Geri kalan 19 izolatta (15F, 3F, 14F, M1, M3, M5, T9, T10, T12, T16, sh5, sh7, sh10, Fg4, Fg18, Fg56, Fg174, Fg5, Fg165) *nad2* geni polimorfik olarak çoğaltıldı. Ancak beklenen 5192 bç'lik tek bir ürün yerine boyutları 250-5000 bç arasında değişen çok sayıda fragment elde edildi (Şekil 4.5.D). Bu gen varyasyon analizi çalışması analizine dahil edilmedi.



Şekil 4.5: Özgün primerlerle 45 izolat ve iki referans ırkta PZR ile çoğaltılan; (A) *cox3* genine ait 527 bç, (B) *atp9* genine ait 603 bç, (C) *rnl* genine ait 1527 bç ve (D) *nad2* genine ait 250-5000 bç aralığındaki ürünlerin agaroz jel elektroforezi analizi. M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA (Thermo, ABD), NK: Negatif kontrol.

4.6. *cox3* GENİNİN KARAKTERİZASYONU

4.6.1. Dizi ve Dizi Bilgilerinin Analiz Sonuçları ve BLASTN Analizi

43 izolata ait *cox3* geninin dizi analizi sonucu elde edilen nukleotid dizilim bilgisi veritabanında kayıtlı PH-1 referans ırkının dizilim bilgisi temel alınarak BLASTN analizi ile karşılaştırıldı. T7, T10 ve Fg174 izolatlarına ait dizilim sırası referans ırka göre çok farklı olduğu için BLASTN analizine alınmadı. Geri kalan 40 izolataın nukleotid diziliminde referansa göre transisyon ve transversiyon tipinde baz değişimlerinin, tekli ve ikili delesyon ve insersiyonların bulunduğunu gösterdi (Şekil 4.6).

F8	GGTGTATT-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTCCACGGATTACACGTTATTA
3F	GGTGTATT-TGGAGCATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTACCACGAATTACACGTTATTA
2F	GGTGTATT-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTCCACGGATTACACGTTATTA
T11	GGTGTATT-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTCCACGGATTACACGTTATTA
Fg56	GGTGTATT-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTCCACGGATTACACGTTATTA
sh15	GGTGTATT-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTCCACGGATTACACGTTATTA
M10	GGTGTATT-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTCCACGGATTACACGTTATTA
sh1	GGTGTATT-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTCCACGGATTACACGTTATTA
F7	GGTGTATT-TGGAGCATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
sh4	GGGGGATT-TGGACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
H-11	GGTGTATT-TGGTACGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
F6	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGG-ACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
M9	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
15F	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
1F	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
6F	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
14F	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
PH-1	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
F9	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
7F	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
F49	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
M7	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
Fg5	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
5F	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
4F	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
T16	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
F5	GGTGTATT-TGGTACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
T3	GGTGGATG-TGGGACATGGTTCCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGCTCCACGTTATTA
T9	GGTGTATT-TGGAGCATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGATTACACGTTATTA
M5	GGTGTATT-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACTGGGTCCATGGATTACACGTTATTA
sh7	GGTGTATT-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTCCATGGATTACACGGTATTA
T12	GGTGGATG-TGGGACGTGGTTCCTT-CTTCGGTACTGGGTCCACGGATTACACGGTATTA
M6	GGTGTATG-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTCCACGGATTACACGTTATTA
T2	GGTGTATG-TGGGACGTGGTTCCTT-CTTCGGTACAGGTTCCACGGATTACACGTTATTA
88-1	GGTGTATT-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTCCACGGATTACACGTTATTA
M1	GGTGTATT-TGGAACATGTTTCTT-CTTCGGTACAGGTTACCACGGATTACACGCTATTA
Fg18	GGGGGATT-TGGAACATGTTTCTTCGCTTCGGTAC-AGGTTCCACGGATTACACGTTATTA
sh13	GAACATATT-GGAAACATGTTTCTT-CTTCGTTACTAACAACCT-CGGGTTACACTTTATTA
sh10	GGTGTATT-TGGTACATGCTCTTC-TTCGGTACTGGGTCCATGACATAAAGGTTAT-A
M3	GAAAGATAATATGACATGGTTCAG-CTTTGGTACTGGATACCATGGCTTAGACCCATT-
Fg165	AATGAATG--GGGGAGAGTAGCTT-CTTAATCACCGTTTTCCCGTAATTAACCTTACTG
	* * * ** * *

Şekil 4.6: 40 izolattan çoğaltılan *cox3* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 referans genomu ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazıları temsil etmektedir. PH-1 nukleotid dizilimi kutu (□) içerisine alınarak, transversiyon ve transisyon tipindeki baz değişimlerine verilen örnekler ise kalın ve büyük puntolu bazlar ile gösterilmiştir.

NJ algoritması kullanılarak hesaplanan benzerlik indeksine göre üç izolatin (1F, 15F, M9) PH-1 referans genomuna en yakın (%100) izolatlar olduğu saptandı. Tez çalışması kapsamında karakterizasyonu yapılan izolatlar arasında nukleotid dizilimleri bire bir identik olan çiftler de belirlendi: 15F/6F, 15F/14F, 15F/1F, 15F/M9, 6F/14F, 1F/M9, 2F/T11, 2F/Fg56, 2F/sh15, T11/Fg56, T11/sh15, Fg56/sh15. En yüksek varyasyona (%70,903) sahip iki izolatin M3 ve Fg165 olduğu gösterildi.

4.6.2. ORF ve BLASTP Analizi

Yapılan analiz sonucu PH-1'in *cox3* genine ait 144 bç'den oluşan ORF'sinin 38 amino asidin kodlanmasından sorumlu olduğu belirlendi. *F. graminearum* izolatlarının *cox3* genine ait ORF dizilimi referans genomun ORF'si dikkate alınarak tayin edildi. ORF analizi ile belirlenmiş ancak dizi homolojisi göstermeyen alternatif ORF'ler değerlendirme dışı bırakıldı. Hizalanan dizilim bölgesi 23 izolatin (Fg174 ve F49 hariç) ORF boyutu ve şifrelenen amino asit sayısı bakımından PH-1 ile aynı olduğunu gösterdi (Şekil 4.7).

```

2F      MFLLRYRFPRITRYRYRNILISGFMKNIFIPFNRSSPS-
88-1    MFLLRYRFPRITRYYEYNILISGFMKNIFIPFNRSSPS-
F8      MFLLRYRFPRITRYRYRNILISGFMKNIFIPFNRSSPS-
Fg56    MFLLRYRFPRITRYRYRNILISGFMKNIFIPFNRSSPS-
sh1     MFLLRYRFPRITRYRYRNILISGFMKNIFIPFNRSSPS-
sh15    MFLLRYRFPRITRYRYRNILISGFMKNIFIPFNRSSPS-
T11     MFLLRYRFPRITRYRYRNILISGFMKNIFIPFNRSSPS-
3F      MFLLRYRLPRITRYRYRNILISGFMKNIFIPFNRSSPS-
Fg18    MFLASVQVPRITRYRYRNIPIRGFMKNIFLRFNRSSPS-
sh7     MFLLRYRVPWITRYRYRNILISGFMKNIFVFPFNRSPAS-
F7      MFLLRYWVPSITRYRYRNILISGFMKNIFIPFNRSSSS-
M5      MFLLRYWVPWITRYRYRNILISGFMKNIFIPFNRSSSS-
PH-1   MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMKNIFIPFNRPSSS-
F5      MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMKNIFIPFNRPSSS-
1F      MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMKNIFIPFNRPSSS-
T16     MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMENIFIPFNRPSSS-
M9      MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMKNIFIPFNRPSSS-
15F     MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMKNIFIPFNRPSSS-
F9      MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMKNIFIPFNRPSSS-
6F      MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMKNIFIPFNRPSSS-
14F     MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMKNIFIPFNRPSSS-
4F      MFLLRYWVPWLPRYRYNILIRGFMKNIFIPFNRPSSS-
FG174   MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMKNMFIPFNRPSSIL
5F      MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMKNIFIPFNRLIII-
M7      MFLLRYWVPWLPRYRYNILISGFMKNIFIPLTRAIKS-
F49     MFLLRYWVPWEPRYRSHIEISGKEKNIFPPSGAMEKD
***      . * . : . *** . : * * * . : * : * .

```

Şekil 4.7: 24 izolattan çoğaltılan *cox3* geninin ORF'si tarafından tayin edilen amino asit dizilerinin referansa ait dizilimlerle karşılaştırıldığı BLASTP analizine ait kısmi bölge. * identik amino asitleri, · tek amino asit farklılıklarını, : birden fazla amino asit farklılıklarını temsil etmektedir. Referansa ait dizilimden farklı taşınan amino asitler üzeri sarı ile boyanarak gösterilmiştir.

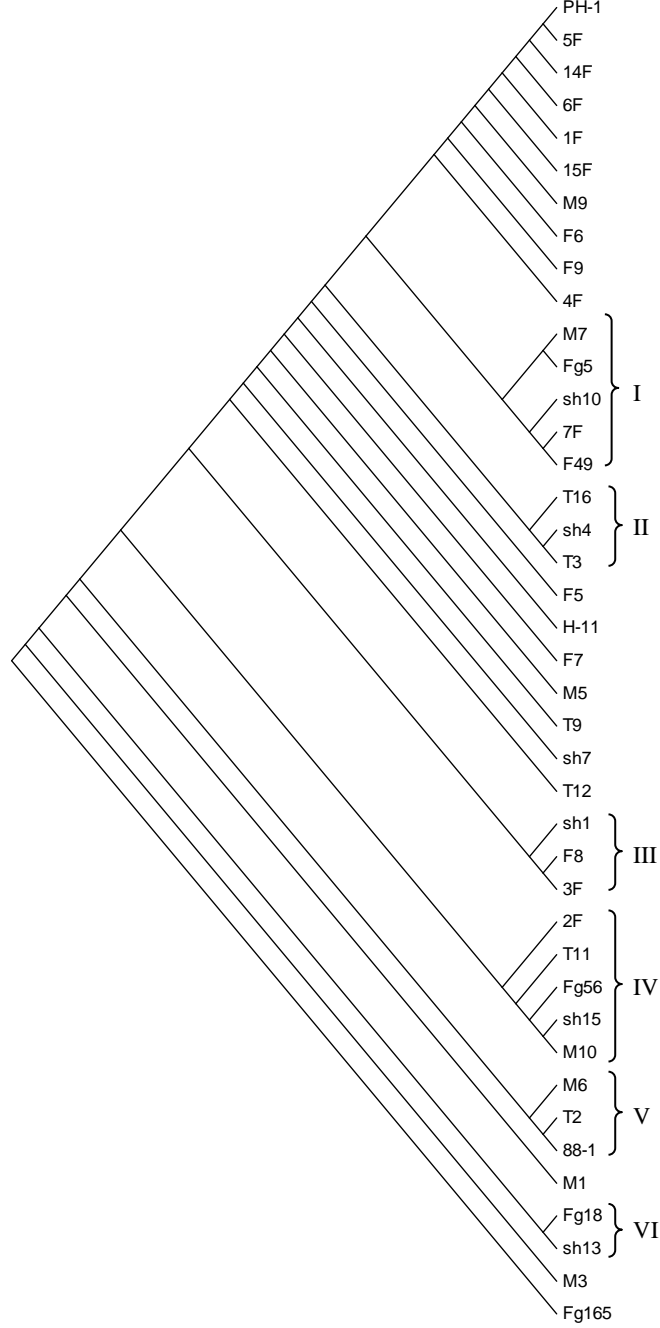
F5, 1F, M9, 15F, F9, 6F, 14F, 4F izolatlarına ait *cox3* geninin ORF'sinin kodladığı amino asit diziliminin PH-1 referansı ile identik olduğu, T16'nın ise bu izolatlardan tek bir amino asit bakımından farklı olduğu gösterildi. İki izolatta (Fg174 ve F49) ORF'nin 39 amino asidi kodladığı belirlendi. Bunlar arasında Fg174'ün referanstan farklı olarak son iki amino asidi izölösün ve lösün olarak taşıdığı, F49'un ise çeşitli pozisyonlarda toplam 14 amino asitlik çeşitliliğe sahip olduğu gösterildi. Geri kalan 12 izolatta 3-10 amino asit arasında değişen farklılığın olduğu, bunlar arasında 7 amino asitlik farkın ortak pozisyonlarda taşındığı belirlendi (Şekil 4.8). Bu grupta baz değişimlerinin etkili olduğu, çerçeve kayması mutasyonlarının meydana gelmediği gözlemlendi.

T9 ve sh4'e ait 101 bç'den oluşan ORF'nin ilk 45 nukleotidinin referansla identik olarak paylaşıldığı, sentezlenen polipeptidin başlangıçtaki 15 amino asidinin ortak kodlanabileceği gösterildi. Bir izolatta (Fg165) 38 amino asidin kodlanmasından sorumlu ORF'nin tamamen referanstan farklı olduğu saptandı. Geri kalan 13 izolatın (F6, H-11, M3, M6, sh10, sh13, sh14, T2, T3, T12, 7F, T7, sh15), boyutu 39-100 amino asit arasında değişen polipeptid zincirini sentezlenebileceği ortaya kondu. M1 izolatının *cox3* geninin nukleotid diziliminde ORF TARAMA programı ile bir ORF saptanamadı. Sonuç olarak toplamda 27 izolata ait nukleotid dizilimi meydana gelen çerçeve kayması mutasyonlarının yol açtığı değişimlerden dolayı *cox3* geninin varyasyon analizi taramasına dahil edilmedi.

4.6.3. Filogenetik Analiz Sonuçları

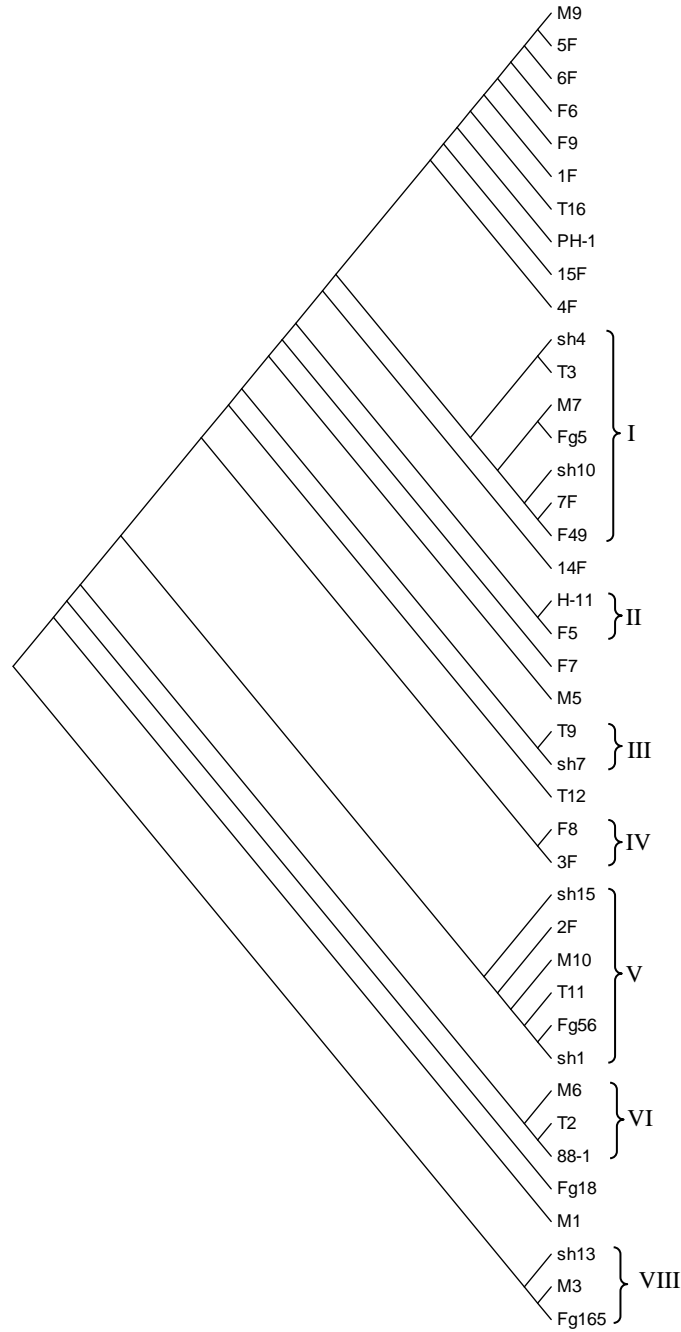
41 *F. graminearum* izolatında *cox3* geninin nukleotid dizisindeki en yüksek varyasyon olasılığı temel alınarak yapılan analizde filogenetik ağaç ML'a göre oluşturulmuştur (Şekil 4.8). Kladogram topolojisinde monofiletik ve polifiletik dallanma paternleri bir arada taşınmaktadır. Kladogramda altı iç dallanma grubu bulunmaktadır. İç dallar dışında kalan 20 izolat (PH-1, 5F, 14F, 6F, 1F, 15F, M9, F6, F9, 4F, F5, H11, F7, M5, T9, sh7, T12, M1, M3, Fg165) evrimsel düzeyde bağımsız olarak erken dönemde ayrılmış, dış nodlarla ilişkili olan günümüz formlarını temsil etmektedir. Grup VI'da Fg18 sh13 izolatı ile bir arada bulunmaktadır. Grup I'de bir arada bulunan M7 ve Fg5 aynı iç gruptaki sh10 ve 7F/Fg49 ikilisinden evrim sürecinde daha önce ayrılmıştır. İç gruplarda üçlü yer alan izoaltlarda grup II'deki T16, sh4 ve T3'den, III'deki sh1 F8/3F ikilisinden, V'de ise M6, T2 ve 88-1'den erken dönemde ayrılmıştır. sh15 ve M10'u bir

arada içeren grup IV'de 2F, T11 ve Fg56 bu ikiliden sırasıyla erken dönemde ayrılan üç izolattır.



Şekil 4.8: *cox3* genin nukleik asit dizisinin ML analizine göre oluşturulan 41 *F. graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.

41 *F. graminearum* izolatının filogenetik analizi MP'ye göre yapıldığında *cox3* gen dizilimi temel alınarak oluşturulan kladogram Şekil 4.9'da verilmektedir.



Şekil 4.9: *cox3* genin nukleik asit dizisinin MP analizine göre oluşturulan 41 *F. graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.

Kladogram topolojisi monofiletik ve polifiletik dallanmalardan oluşmuştur. Kladogramda yedi iç grup (I-VII) bulunmaktadır. Gruplar dışında kalan 16 izolat (M9, 5F, 6F, F6, F9, 1F, T16, PH-1, 15F, 4F, 14F, F7, M5, T2, Fg18, M1) evrimsel düzeyde erken dönemde bağımsız olarak diğer izolatlardan ayrılmıştır. İç grup II, -III ve -IV'de izolatlar bir arada (sırasıyla H-11/F5, T9/sh7, F8/3F) bulunmaktadır. Grup VI'da M6,

T2 ve 88-1 ikilisinden, -VII'de sh13, M3/Fg165 ikilisinden daha önce ayrılmış izolatlardır. Grup I'de sh4 ve T3 ikilisi; sırasıyla M7/Fg5 ikilisinden, sh10'dan ve 7F/F49 ikilisinden önce ayrılmıştır. V. iç grupta Fg56 ve sh1 ikilisinden evrimsel olarak sırayla bağımsız ayrılan izolatlar; sh15, 2F, M10, T11'dir.

4.7. *atp9* GENİNİN KARAKTERİZASYONU

4.7.1. Dizi ve Dizi Bilgilerinin Analiz Sonuçları ve BLASTN Analizi

atp9 genine ait dizilim bilgisi 18 izolattan çoğaltılan ve saflaştırılan örneklerle birlikte referans genomun dizilimiyle BLASTN analizi ile karşılaştırıldı ve sh4 izolatu sahip olduğu farklı baz sırasından dolayı varyasyon analizinde kullanılmadı (Şekil 4.10).

T3	TATATTTAAA-CCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTACG
H-11	TATATTTAAA-CCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTACG
M9	TATATTTAAAACCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTACG
F5	TATATTTAAAACCGT G TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTACG
1F	TATATTTAAAACCGT-TCAACGCACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTACG
15F	TATATTTAAAACCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTACG
PH-1	TATATTTAAAACCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTACG
M7	TATATTTAAAACCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTACG
7F	TATATTTAAAACCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTACG
sh10	TATATTTAAAACCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTGCG
T16	TATATTTAAAACCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTACG
F9	TATATTTAAAACCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAAGAATTCTACG
F6	TATATTTAAAACCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTAGAAGTATTAACAATAATTCTACG
6F	TATATTTAAAACCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTACCAATAATTCTACG
2F	TAT G TTAAAACCGTTCACCG-CCTAGTAGATGAGTAAAAGTATAACCAATAATTCT-CG
Fg5	TATATTTAA C ACCGT-TCAACG-GCTAGTAGATGAGTC-AAGTATTATCAATAATTCTACG
F49	TATATTTAAAACCGT-TCAACG-ACTAGTAGATGAGTA-AAGTATTAACAATAATTCTACG
M3	TATATTTAAA-CCGT-CCAACCAGTTGTAGATGAGTA--AGTATTAACAATAATTCTACG
	*** ** *

Şekil 4.10: 17 izolattan çoğaltılan *atp9* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 referans genomu ile BLASTN analizine ait kısmi bölge.

* identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazları temsil etmektedir. PH-1 nukleotid dizilimi kutu (□) içerisine alınarak, transversiyon ve transisyon tipindeki baz değişimlerine birer örnek ise kalın ve büyük puntolu bazlar ile gösterilmiştir.

Geri kalan 17 izolatu nukleotid dizilimi referans ırkla karşılaştırıldığında transisyon ve transversiyon tipinde baz değişimlerinin bulunduğu belirlendi. M3 izolatu bulunan dokuz (9) nukleotidlik insersiyon bölgesinin yanı sıra diğer izolatlarda tekli, ikili ve üçlü insersiyonların ve tekli delesyonların varlığı gösterildi.

PH-1 referans genomuna en yakın (%98,859) izolatların F9 ve M7 olduğu, karakterizasyonu yapılan izolatlardan sh10 ve T16'nın en yüksek benzerliğe (%98,476)

sahip olduğu ortaya kondu. En yüksek polimorfizm (%38,068) ise M3 ve F49 izolatlarından elde edildi.

4.7.2. ORF ve BLASTP Analizi

1F, 2F, 6F, 7F, 15F, F5, F6, Fg5, H-11, M7, M9, T3, T16, sh10 izolatlarında referans genomda olduğu gibi 177 bç'lik bir ORF bölgesinin aynı boyutta (59 amino asit) polipeptid zincirini sentezleyebileceği ortaya kondu (Şekil 4.11). Ancak T3 izolatında referansdan farklı olarak serin, alanin ve sistein amino asitlerinin, 2F izolatında ise lösin amino asidinin taşındığı gösterildi. Polipeptid zincirinde en yüksek polimorfizm Fg5 izolatında saptandı. Altı (6) pozisyonda farklı amino asitlerin (valin, tirozin, prolin, histidin, serin ve treonin) varlığı Şekil 4.12'de gösterildi. M3 izolatında 40 amino asidin kodlanmasından sorumlu olan ORF'nin PH-1 ırkıdan tamamen farklı olduğu ortaya kondu.

```

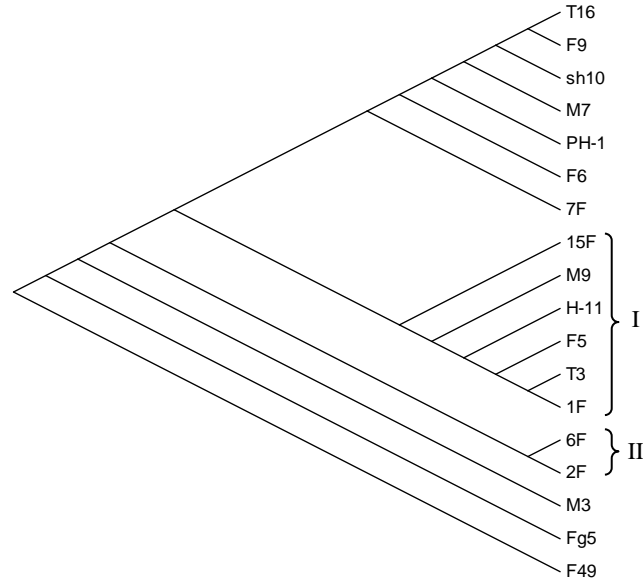
PH-1      MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
F5        MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
SH10     MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
1F        MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
T16      MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
F9        MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
M9        MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
M7        MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
H-11     MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
15F      MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
2F        MAFYLILKFNLIICRKRKISTKINNTVNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
T3        MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNSACNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
6F        MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
7F        MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
F6        MAFYLILKFNFCRKRKISTKINNTTFNSPSSQNPIKTYDPLNEREIRKDNNGKIGVYV
Fg5      MAFYLIVKYNFCRKRISPKINNTTFNSPSSQNPIKTYDSTEREIRKDNNGKIGVYV
*****.*.*:*****.****.: *****.*****.*****

```

Şekil 4.11: 17 izolattan çoğaltılan *atp9* geninin ORF'si tarafından tayin edilen amino asit dizilerinin referansa ait dizilimlerle karşılaştırıldığı BLASTP analizine ait kısmi bölge.* identik amino asitleri, · tek amino asit farklılıklarını, : birden fazla amino asit farklılıklarını temsil etmektedir. Referansa ait dizilimden farklı taşınan amino asitler üzeri sarı ile boyanarak gösterilmiştir.

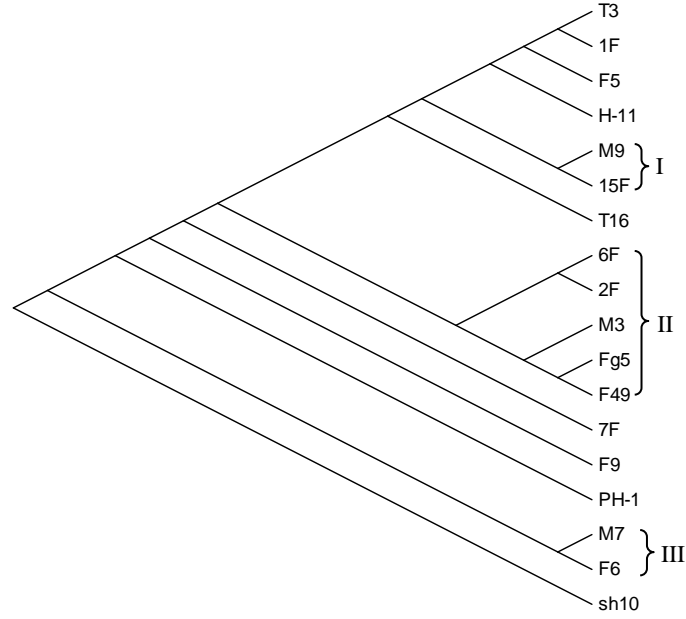
4.7.3. Filogenetik Analiz Sonuçları

17 *F. graminearum* izolatında *atp9* geninin ML'ye göre yapılan filogenetik analizinde iki iç dallanma grubu (biri polifiletik diğeri monofiletik) gösteren kladogram oluşturuldu (Şekil 4.12). İç dallar dışında kalan 10 izolat (T16, F9, sh10, M7, PH-1, F6, 7F, M3, Fg5, F49) evrimsel düzeyde bağımsız olarak erken dönemde ayrılmış günümüz formlarını temsil etmektedir. Grup I T3 ve 1F ikilisinden evrim sürecinde bağımsız ayrılan izolatları içermektedir. Bunlar sırasıyla; 15F, M9, H-11, F5'dir. Grup II'de ise 6F ve 2F izolatlarını bir arada bulunmaktadır.



Şekil 4.12: *atp9* genin nukleik asit dizisinin ML analizi göre oluşturulan 41 *F. graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.

17 izolatu MP'ye göre yapılan filogenetik analizinde yapıldığında *atp9* gen dizilimi temel alınarak oluşturulan kladogram (Şekil 4.13) topolojisi iki monofiletik, bir polifiletik iç gruptan (I-III) oluşmuştur. Gruplar dışında kalan 9 izolat (T3, 1F, F5, H-11, T16, 7F, F9, PH-1, sh10) evrimsel düzeyde erken dönemde bağımsız olarak diğer izolatlardan ayrılmıştır. İç grup I, ve -III'de ikili izolatlar bir arada (sırasıyla M9/15F, M7/F6) bulunurken, grup II'deki 6F/2F ikilisi M3 ve Fg5/F49 ikilisinden evrimsel süreçte daha önce ayrılmıştır.



Şekil 4.13: *atp9* genin nukleik asit dizisinin MP analizi göre oluşturulan 17 *F. graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.

4.8. *rnl* GENİNİN KARAKTERİZASYONU

4.8.1. Dizi ve Dizi Bilgilerinin Analiz Sonuçları ve BLASTN Analizi

26 izolat ile referans genom arasında gerçekleştirilen hizalama analizleri sonucunda izolatlar arasında 1-13 nukleotidlik delesyonlu bölgelerin yanı sıra 1-22 nukleotidlik insersiyon bölgelerinin varlığı belirlendi (Şekil 4.14). Ek olarak izolatlar arasındaki transisyon ve transversiyon tipindeki nukleotid değişimleri ortaya kondu. Dört izolattan (3F, 1F, T7, sh10) elde edilen dizilim bilgisi, referans genom ile farklılığından dolayı çalışma dışında bırakıldı. PH-1 referans genom ile en yüksek benzerlik T16'da bulundu (%96,867). İzolatlar arasında en yüksek benzerlik M6 ile Fg18 arasında %94,417 olarak hesaplanırken en uzak izolatların (%82,741) F7 ve Fg5 olduğu belirlendi.

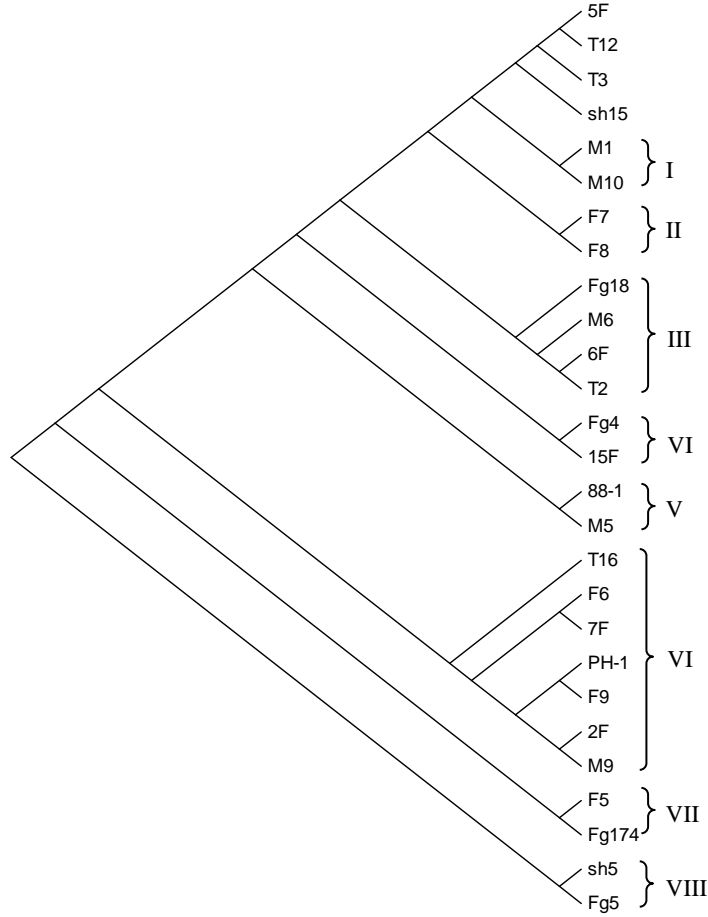
F5	CAAGTG-ATAA-TGG-TGCCAT-GAGTAACTAAAAGAAAA-----TTT-CC-GCC-
Fg174	-AAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAA-----TTTTCC-GCC-
PH-1	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAA-----TTTTCC-GCC-
T16	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAA-----TTTTCC-GCC-
2F	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAA-----TTTTCC--CC-
M9	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAA-----TTTTCC-GCC-
F9	CAGGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAA-----TTTTCC-GCC-
F6	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAA-----TTTTCC-GCG-
7F	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAA-----TTTTCC-GCC-
Fg4	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAA AATAAAA -TTTTTCC-GCC-
15F	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAAAATAAAA-TTTTTCC-GCC-
M1	CAAGTG-ATAA-TG--TGACAT-GAGTA-CTAAAAGAAAAAATAAAA-TTTTTCC-GCC-
M10	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAAAATAAAA-TTTTTCCCGCC-
88-1	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAAAATAAAA-TTTTTCCCGCC-
sh15	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAAAATAAAA-TTTTTCC-GCC-
M6	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAAAATAAAA--TTTTTCC-GCC-
Fg18	CAAGTG-ATAA-TGG-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAAAATAAAA-TTTTTCC-GCC-
T3	CAAGTG-ATAA-TGA-TGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAAAATAAAA-TTTTTCC-GCC-
5F	CAAGGG-ATAA-TGGGTGACAT-GAGTAACTAAG-GAAAAAATAAGA-TTTTTCC-GCC-
T12	CAAGTG-AGAG-TGA-TGACAT-GAGTAACTAAA-GAAAAAATAAGA-TTTGTCC-GGC-
F7	CAAGTG-ATGAGTGGTTGACAT-GAGTAACTAGAAGAAAAAATAAAA--TTTTTCCGCC-
F8	CAAGTG-ATAA-TGGGTGACAT-GAGTAACTAAAAGAAAAAATAAAAATTTTTCCCGCC
6F	CAAGGT-AAAA-TG T --GACATTTGGGTAAGTACAGGAAAAAATAAAAATTTCCG--CC-
T2	CAAGTG-ATAA-TGG--GGCAT-GAGTAACTAA----AGAAAAAATAAATTTTC--CC-
M5	CAAG--GTAATGG-----GCCGAGAT T CTCAAAGAAAAAATAAAA--TTTTCC--CC-
sh5	T AACTACGTAGTTAAACCGAGCGTTAACGCTCGGTTA-CTACGTAGTTAAACCGAGCGT
Fg5	TAAC T ACGTAGTTAAACCGAGCGTTAACGCTCGGTTAACTACGTAGTTAAACCGAGCGT
	* * ** *

Şekil 4.14: 26 izolattan çoğaltılan *rnl* geninin nukleotid diziliminin *F. graminearum* PH-1 referans genomu ile BLASTN analizine ait kısmi bölge.

* identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazları temsil etmektedir. PH-1 nukleotid dizilimi kutu (□) içerisine alınarak, transversiyon ve transisyon tipindeki baz değişimlerine birer örnek ise kalın ve büyük puntolu bazlar ile gösterilmiştir.

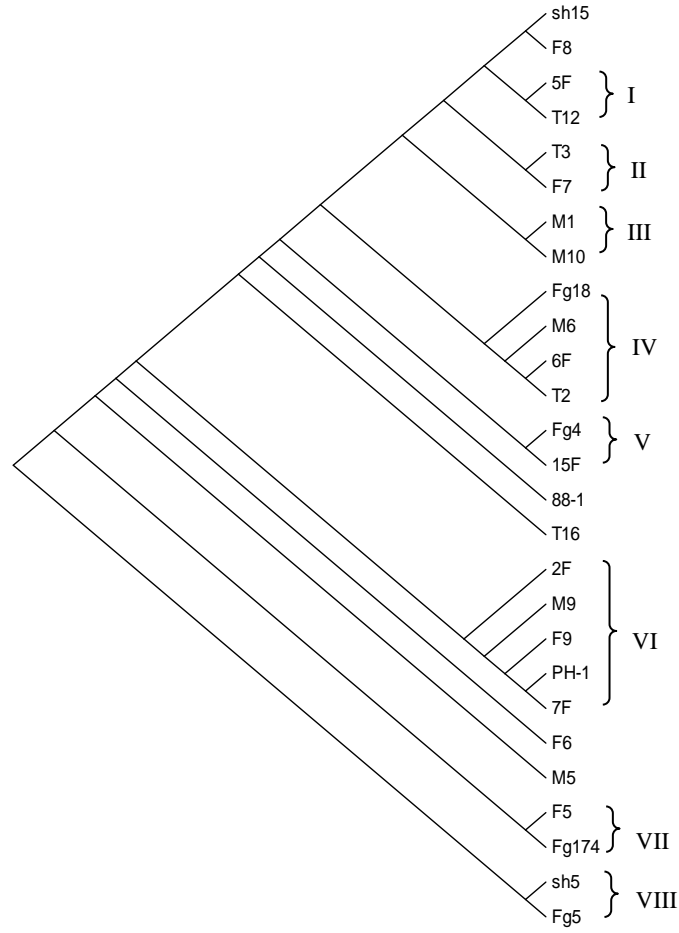
4.8.2. Filogenetik Analiz Sonuçları

27 *F. graminearum* izolatında *rnl* geninin ML'ye göre yapılan filogenetik analizinden ikisi polifiletik altısı monofiletik iç dallanma gösteren kladogram elde edilmiştir (Şekil 4.15). İç dallar dışında kalan 4 izolat (5F, T12, T3, sh15) evrimsel düzeyde bağımsız olarak erken dönemde ayrılmış dış nodlarla ilişkili olan günümüz formlarını temsil etmektedir. Grup I, -II, -IV, -V, -VII ve -VIII'de sırasıyla M1/M10, F7/F8, Fg4/15F, 88-1/M5, F5/Fg174, sh5/Fg5 ikilileri bir arada bulunmaktadır. Grup III'de Fg18, M6 ve 6F izolatları aynı iç gruptaki 6F/T2 ikilisinden daha erken dönemde ayrılmıştır. Grup VI'de ise F6/7F, PH-1/F9, 2F/M9 ikilileri ortak dış noddan T16 izolatından evrimsel süreçte daha geç dönemde ayrılmıştır.



Şekil 4.15: *rnl* genin nukleik asit dizisinin ML analizi göre oluşturulan 27 *F.graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.

27 izolatu *rnl* gen dizilimi temel alınarak yapılan filogenetik analizde (MP temelli) altısı monofiletik, ikisi polifiletik iç gruplara ek olarak bağımsız ayrılmış olan 6 izolat (sh15, F8, 88-1, T16, F6, M5) kaldogramda yer almaktadır (Şekil 4.16). İç grup I, -II, -III, -V, -VII ve -VIII'de izolatlar sırasıyla 5F/T12, T3,F7, M1/M10, Fg4/15F, F5/Fg174 ve sh5/Fg5 ikilileri şeklinde bir arada bulunmaktadır. Grup IV'de bulunan sırasıyla Fg18 ve M6, 6F/T2 ikilisinden evrimsel süreçte daha önce ayrılmıştır. Grup VI'da ise PH-1 ve 7F ikilisi ise 2F, M9 ve F9 izolatlarından daha geç dönemde ayrılmıştır.



Şekil 4.16: *rnl* genin nukleik asit dizisinin MP analizi göre oluşturulan 27 *F. graminearum* izolatu arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Romen rakamları iç dal gruplarını göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yüksek lisans tez projesi kapsamında, Türkiye ve İran'da hastalıklı arpa, buğday ve mısır bitkilerinden izole edilerek saflaştırılan 45 *F. graminearum* ile birlikte iki referans ırkın (H-11 ve 88-1) mitokondrilerinde kodlanan *nad2*, *cox3*, *atp9* ve *rnl* genlerinin nukleotid dizi varyasyonlarının belirlenmesi ve izolatlar arasında filogenetik ilişkinin kurulması amaçlanmıştır.

Fusarium türlerinde mtDNA varyasyon analizi, genomun restriksiyon endonukleazları ile kesimi sonucu elde edilen uzunluk polimorfizmi temeline dayanan RFLP markır profillemesi ile gerçekleştirilmiştir (Kim ve diğ., 1992; Kim ve diğ., 1993; Láday ve diğ., 2004a; Láday ve diğ., 2004b). Bu çalışma kapsamında ise *F. graminearum* izolatlarında varyasyon analizi ilk defa mitokondride yapısal ve/veya işlevsel olan ürünleri şifreleyen genlerin çoğaltılarak karşılaştırılması prensibine dayandırılmış, elde edilen nukleotid polimorfizminin ORF'de neden olduğu değişimler ortaya konmuş ve izolatlar arasındaki filogenetik ilişki kurulmuştur.

mtDNA'sı nDNA'ya oranla daha fazla mutasyon biriktirmektedir. Gerçekleştirilen mtDNA analizleri tür içi çeşitliliğinin hassas biçimde ortaya konmasına, bireylerin alt tür düzeyinde ayırt edilebilmelerine katkı sağlayabilmektedir (Kistler ve diğ., 1987). mtDNA'sı solunum sırasında meydana gelen elektron kaçakları ve açığa çıkan serbest radikaller nedeniyle oksidatif hasara uğrar. Organelin etkin bir onarım sistemine sahip olmaması ayrıca genlerin seleksiyon baskısına da uğramaması DNA'da meydana gelen mutasyonların birikmesine neden olur (Kazak ve diğ., 2012). Dinamik yapıdaki mitokondride genom, hücre içerisinde meydana gelen füzyon ve fisyon mekanizmaları sonucu sürekli olarak rekombinasyona uğrayabilmektedir (Wasterman, 2010). Sonuç olarak bu mekanizmalar mitokondri genomunda meydana gelen varyasyonların popülasyonda devamlılığına aracı olur.

Genetik olarak farklı hiflerin kaynaşmasıyla oluşan heterokaryon farklı hücresel kombinasyona sahip olur. Aynı eşem tipindeki iki mutant konidya karışımı heterokaryonda bir arada bulunur. Allelik olmayan mutasyonlu iki hücrenin kaynaşması

ile oluşan heterokaryotik miselde, komplementasyonla allerlerin etkileri birbirini tamamladığından, fenotipik farklılık gözlenemez. Allelik mutasyonlu heterokaryonlar - mutasyonlar çoğunlukla işlev kaybına yol açtığından- seçilebilir. Homotallik olan *F. graminearum*'da eşem tipinin tayininden sorumlu *MAT-1* ve *MAT-2* allelleri nDNA'da bir arada şifrelendiğinden heterokaryozis gerçekleştiğinde fenotipte değişim gözlenmez. Ancak, dinamik olan mitokondrilerin füzyona uğraması, genetik olarak farklı kombinasyonlu mitokondri genomlarının oluşumu ile sonuçlanır. Füzyonla meydana gelen rekombinant mitokondriler yavru hücrelere paylaştırılırken aynı kültürden gelen miselyumlar farklı genetik kombinasyonlu mitokondrilere sahip olabilir. Sonuç itibariyle heterokaryozis mitokondri varyasyonuna yol açan mekanizmalardan biri olarak değerlendirilebilirken, mtDNA azalizi sırasında göz önünde bulundurulması gereken önemli bir faktördür (Maheswari, 2007).

Filamentli mantarlarda organelin yavru hücrelere kalıtımı uniparental olarak gerçekleşmektedir. Moleküler düzeyde mitokondri kalıtımı eşem tipini tayin eden nDNA'daki MAT lokuslarının varlığı ile ilişkilendirilebilir. Eşem tipinin belirlenmesinden sorumlu olan *MAT-1* ve *MAT-2* alelleri *F. graminearum*'un nuklear genomunda bir arada taşınmaktadır. Homotallik olan türde farklı eşem hücreleri (askogonyum ve anteridyum) aynı miselyumdan gelişmektedir. Tez çalışması kapsamında 47 izolatta uniparental kalıtım, *MAT-1* ve *MAT-2* idiomorflarının korunmuş domenlerinin PZR ile çoğaltılmasıyla gösterilmiştir. İki idiomorfik allelinin bağlantılı olması domenlerin farklı test tüplerinde çoğaltımını zorunlu kılmıştır. Sonuç olarak tüm örneklerde *MAT-1* idiomorfunun varlığı 210 bç boyutundaki α -kutu (α -box) domeninin, *MAT-2* için ise 260 bç'lik HMG kutu domenin aynı izolatlarda çoğaltılmasıyla gösterilmiştir.

Çalışmada moleküler analizler için; mitokondride ETS'de görevli enzim komplekslerinde elektron taşınmasında görevli enzimlere ait alt birimleri kodlayan (*nad2* ve *atp9*) ya da kompleks IV'ün yapısal bütünlüğünün korunmasında görevli alt birimi şifreleyen (*cox3*) ve mitokondride ribozomun büyük alt biriminin yapısına katılan rRNA'yı kodlayan (*rnl*) farklı genler seçilmiştir. Biyoinformatik araçların kullanıldığı hizalama çalışmaları deneysel aşamaya geçmeden önce yoğun olarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle genlere ait dizilim bilgileri NCBI-nukleotid veri

tabanından elde edilmiştir. Farklı *Fusarium* türleri arasında gerçekleştirilen BLASTN analizleri ile; genler üzerindeki korunmuş ve/veya ortak bölgeler belirlenmiş, intronlara ait dizilerin bulunduğu bölgeler taranarak çoğaltılacak bölge için tasarlanan yeni primer moleküllerinin amplikonda intronları hedefleme olasılığı ortadan kaldırılmıştır.

Çoğaltılarak karşılaştırılması için seçilen genlerden *nad2*, ETS'deki ilk elektron alıcısı olan NADH:ubiquinon oksidoredüktazın membrana çıpalı elektron taşınmasından sorumlu alt birimini şifrelemektedir ve *F. graminearum*'un mtDNA'sından kodlanmaktadır (Sackman ve diğ., 1991). Dizilenmiş *Fusarium* mtDNA'ları arasında gerçekleştirdiğimiz hizalama çalışmaları, *nad2* gen boyutunun türler arasında farklı olduğunu ortaya koymuştur. Bu boyut farklılığından *nad2* geninin aşağı bölgesinde bulunan bir endonukleazı (Heg) şifreleyen dört adet intron bölgesinin sorumlu olduğu bu çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca intron dizilerinin *F. graminearum*'da da, diğer *Fusarium* mitokondri genomlarındaki ilişkili intron bölgeleri ile aynı pozisyonlarda taşındığı biyoinformatik olarak gösterilmiştir. *nad2* geninin 47 izolatta analizinin hedeflendiği çalışmada genin ekson bölgesinin çoğaltımı 7F, sh15 ve H-11'de primer bağlanma bölgelerindeki olası varyasyondan dolayı sağlanamamıştır. Geri kalan 44 izolatta beklenen 5192 bp boyutundaki fragment yerine boyutu 250-5000 bp arasında değişen polimorfik çoğaltım ürünleri elde edilmiştir. Filamentli mantarlarda enzimin membran dışında kalan hidrofilik bölgesindeki iki alt birimin (*nad4* ve *nad5*) kodlanmasından sorumlu genler (*nad4* ve *nad5*) de mtDNA'sında taşınmaktadır. Weiss ve diğ. (1991) bu üç genin nukleotid dizilimleri arasında homolojinin bulunduğunu rapor etmişlerdir. *nad2* geninin intron içermeyen kısmi bölgesinin çoğaltımının hedeflendiği PZR'de primer moleküller özgün olmayan biçimde *nad4* ve *nad5* genlerine de bağlanmış olabilir. Bir diğer olasılık da heterokaryozis ile mtDNA'sında rekombinant bölgelerin meydana gelmesi sonucu primer çiftinin farklı bölgelere bağlanması olabilir. Sonuç itibarıyla mtDNA'sının varyasyonu için seçilen *nad2* geni 47 izolata karşılaştırılması amacıyla gerçekleştirilen analizden çıkarılmıştır. Ancak elde edilen bu veriler *F. graminearum*'un mtDNA'sında *nad2* geninin karakterizasyonunun yapılmasının büyük önem taşıdığını düşündürmektedir.

Tez çalışması kapsamında seçilen ikinci gen, sitokrom c oksidaz enziminin merkezinde bulunan ve hücrel organizasyona sahip canlılarda korunmuş olan üç alt birimden biri

olan COIII'ü şifreleyen *cox3*'tür. *cox3* Fg170 hariç diğer tüm izolatların mtDNA'sından beklenen boyutta (527 bç) çoğaltılabilmektedir. Çok kopyalı DNA molekülüne sahip mitokondrilerin sahip olduğu rekombinasyonun üç izolatta (sh5, Fg4 ve sh15) yetersiz ürün elde edilmesine neden olduğu düşünülmektedir. BLASTN analizleri geri kalan 43 izolatta gerçekleştirildiğinde T7, T10 ve Fg174'e ait nukleotid dizilimlerinin PH-1 referansına ait *cox3* dizisinden tümüyle farklı olduğu gözlenmiştir. Bu üç izolata ait dizilim, veri bankasına kayıtlı tüm nukleotid dizileriyle karşılaştırılmış (Mega BLAST) ancak anlamlı bir benzerlik olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle çalışma dışı bırakılmıştır. Ancak bu üç izolata *cox3* geninin karakterizasyonunun yapılmasının büyük önem taşıdığı düşünülmektedir. Geri kalan 40 izolatta gerçekleştirilen hizalamalar *cox3* geninde transisyon ve transversiyon tipindeki baz değişimlerinin, tekli ve ikili delesyon ve insersiyonların bulunduğu ancak taşınan bu varyasyonların 23 izolatta çerçeve kaymasına neden olmayan sessiz tipte mutasyonlar olduğu gösterilmiştir. Geri kalan 16 izolatta ise nukleotid değişimlerinin ORF'yi değiştirdiği ortaya konmuştur. Çerçeve kayması mekanizması, mevcut genden daha uzun ya da daha kısa polipeptid zincirlerinin dolayısıyla da alternatif işlevli COIII alt birimlerinin sentezi ile sonuçlanabilir. Elde edilen veriler *F. graminearum*'da yüksek oranda *cox3* geni varyasyonunun olduğunu ortaya koymuştur. Bulgularımız *cox3*'ün şifrelediği COIII'ün günümüze kadar hala işlevinin tam olarak ortaya konamamasının nedenini destekler niteliktedir.

atp9 tarafından sentezlenen ATP sentazın c alt birimi, elektrokimyasal gradientten sağlanan enerji ile dönerek konformasyonunu değiştirdiği ATP sentazın işlevsel olmasını sağlar. ATP sentezi için mutlak gerekli olan bu alt birimi şifreleyen gende meydana gelen, işlevi etkilemeyen mutasyonların analizi, filogenetik ilişkilerin kurulmasında kullanışlı veriler sağlayacaktır. Tez çalışmada 26 izolatta *atp9* geni PZR ile çoğaltılamamıştır. Bu durumun primer bağlanma bölgesindeki mutasyonlardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Dizilenen 17 gen bölgesinin hizalama sonuçları tek nukleotid değişimlerine ek olarak delesyon ve insersiyon tipi değişimlerin varlığını da ortaya koymuştur. ORF TARAMA programı ile mutasyonların M3 hariç diğer izolatlarda ORF'yi etkilemediği, 2F, T3 ve Fg5 izolatlarında ise sırasıyla 1, 3 ve 6 amino asidin referansdan farklı şifrelenebileceği gösterilmiştir. İşlev değişimine yol açmayan bu mutasyonların analizi sonucu elde edilen bulgular izolasyonlar arasındaki

filogenetik ilişkinin oluşturulmasına katkı sağlamıştır. M3 izolatında analizi yapılan bölgede SNP'lere ek olarak tekli, ikili, üçlü ve on nukelotidlik insersiyonlar, tek ve ikili delesyonların taşındığı belirlenmiştir. Bu izolatta mutasyonların ürün boyutunu ve genin ORF'sini etkilediği gösterilmiştir. ORF TARAMA programında diğer izolatlardan farklı olarak genin başka bir bölgesinden tespit edilmiştir. Bu nedenle BLASTP algoritmasıyla karşılaştırma analizine dahil edilmemiştir. Kültür ortamında üretildiğinde solunumla ilişkili bir kusuru gözlenmediğinden taşınan mutasyonların enzimin işlevini etkilemediği yorumuna gidilmiş, bu nedenle *atp9* gen dizilim bilgisi BLASTN algoritmasıyla karşılaştırma analizlerinde ve aynı zamanda gerçekleştirilen filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

Filogenetik ilişkilerin ortaya konmasında en çok tercih edilen genlerden biri olan ribozomun büyük alt birimini şifreleyen *rnl*'nin kısmi bölgesi 14F ve H-11 izolatları hariç geri kalan 45 izolattan PZR ile çoğaltıldı. Ancak saflaştırma işlemlerinde kullanmak üzere genin yüksek hacimde çoğaltımının hedeflendiği PZR'de 12 izolattan yeterli miktarda ürün alınamadı. Aynı kalıp moleküllerin kullanıldığı deneme setlerinde karşılaşılan bu farklı bulgu 12 izolatın saf kültürleri kurulmadan önce heterokaryozise uğramış olduğunu düşündürmektedir. Heterokaryozis mekanizması sadece mtDNA'sında rekombinasyonun oluşumunu tetiklemekle kalmaz aynı zamanda birbirinden farklı ebeveynlerden gelen mitokondrileri ve dolayısıyla mtDNA'larının mozaik bir biçimde taşınmasına da neden olur. Bu durumda uniparental kalıtım gösteren bireylerde diğer ebeveynlerden gelen mitokondrilerin de yavru hücrelere eşit olamayan bir biçimde aktarılması söz konusu olabilmektedir. Sonuç itibarıyla laboratuvar koşullarında iki farklı kaynaktan gelen mtDNA'sının PZR manipülasyonunda kullanımı her denemede farklı bulguların eldesine yol açmış olabilir.

Tez çalışmasında *F. graminearum* izolatları arasındaki filogenetik ilişki karakter temelli yöntemler kullanılarak kuruldu. Oluşturulan filogenetik ağaçlar, intronların çoğaltılan bölgelerin dışında bırakıldığı *cox3*, *atp9* ve *rnl* genlerinin nukleik asit dizisi ile ilişkili olarak *F. graminearum* izolatları arasındaki evrimsel ilişkiyi gösterdi. BLASTN analizleriyle saptanan nukleotid varyasyonları ile kurulan filogenetik ağaçlardaki bireylerin birbirleri ile olan mesafesinin uyumlu olduğu belirlendi. Herbir gen için izolatların evrimsel ilişkisi istatistik yöntemlerinden MP ve ML kullanılarak oluşturdu.

Filogenetik ağaçta ortak atayı temsil eden başlangıç noktasından ayrılan dış nodlar ve bu nodlardan ayrılan iç nodlar (iç grup) dallanma patern tiplerini, dal uzunlukları da genlerde taşınan varyasyonların miktarlarını temsil etmektedir. MP az sayıda yüksek homoloji gösteren dizilimlerin değerlendirilmesinde en çok kullanılan yöntemdir. Varyasyonları içeren dizilimlerden elde edilen veriyi açıklamak için MP’de gerekli olan değişim sayısı en aza indirgenerek hesaplama yapılmaktadır. ML’de ise değerlendirme, deneysel gözlemlerden elde edilen verinin en yüksek olasılığı kullanılarak gerçekleştirilir (Yang, 1996). Bu nedenle filogenetik ilişki SNP’leri, insersyon ve delesyonları taşıyan, boyutları sırasıyla 527, 603 ve 1527 bç olan, *cox3*, *atp* ve *rnl* genlerine ait nukleik asit dizilimi temelli olarak hem MP hem de ML yaklaşımına göre kurulmuş ve hazırlanan ağaçlarla sunulmuştur. Filogenetik ağaçlarda dış dallardan ayrılan ve iç dallanma göstermeyen izolatlar evrim sürecinde diğerlerinden erken aşamada ayrılan bireylerin günümüz formlarını temsil etmektedir. İç grupların da değerlendirilmesi benzer biçimde yapılmakta, en uçta bir arada bulunan ikili izolatlar dış noddan en geç ayrılan izolatları temsil ederken aradaki bağımsız alt dallar sırasıyla evrimsel süreçte ayrılan bireyleri göstermektedir. Çalışmamızda SNP’leri, insersyon ve delesyonları taşıyan büyük boyutlu bölgelerin istatistiksel analizinde ML ile elde edilen ağaçlar filogenetik ilişkisinin kurulmasında daha kullanışlı verileri sunmuştur.

İzolatlar arasındaki mtDNA dizi varyasyonları, ilişkili genler için mesafe temelli küme analizi yöntemlerinden UPGMA (ing., unweighted pair group method with arithmetic mean) yerine NJ algoritması kullanılarak hesaplanmıştır. Ardışık kümeleme algoritması olan UPGMA aritmetik ortalamaya göre karma bir işlevsel üniteyi oluşturduğundan, en yakın ilişkili bireyler bu algoritma ile ayrılamazlar (Backeljau ve diğ., 1996). Bu nedenle varyasyonun filogenetik olarak ilişkilendirilmesinde NJ algoritmasının kullanımı tercih edilmiştir. *cox3* genindeki dizi varyasyonlarına göre izolatlar ikili olarak karşılaştırıldığında çoğaltımı yapılan 13 gen bölgesinin bir ya da birden fazla işlevsel domeni paylaştığı, iki izolat hariç diğerlerinde gen dizilimlerinin ilişkili olduğu, M2-Fg165 arasında ise nukleotid dizilerinin işlevsel olarak farklı olabileceği (benzerlik < %30) bulundu. Benzer şekilde *atp9* geni analiz edildiğinde tüm izolatlarda bir ya da birden fazla domenin ortak taşınabildiği gösterildi. *rnl* genine ait çoğaltım bölgesi değerlendirildiğinde ise izolatların daha çok ilişkili dizileri taşıdığı (%30-50 benzerlik) bir ya da birden fazla ortak domenin paylaşılabilmesi belirlendi. Ancak sh5-Fg4, sh5-

15F ikili izolatları ve beş izolat (T2, T12, sh5, Fg4, Fg5) hariç Fg5 ile diğer tüm izolatların ikili kombinasyonlarında gene ait nukleotid dizilerinin sadece ilişkili olabileceği gösterildi. Nukleotid dizisi bakımından en büyük çeşitlilik bu genden elde edildi. İzolatlardan Fg5'in *rnl* geninin tüm nukleotid dizisinin karakterizasyonunun önemli olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen bulgular mtDNA varyasyon analizi için seçilen üç genin filogenetik ilişkiyi ortaya koymada uygun hedefler olduğunu kanıtlamıştır. Özellikle ETZ'de önemli işleve sahip enzimlerin alt birimlerini kodlayan *cox3* ve *atp9* genlerinde meydana gelebilecek ve enzimin işlevini etkileyebilecek mutasyonlar seleksiyon baskısına uğrayacağından popülasyonda izlenemezler. Ancak ürünü rRNA olan *rnl* herbir ribozomda farklı nukleotid dizilimlerine sahip olsa da seleksiyon baskısına uğrayamayacağından varyasyonu popülasyonda izlenebilir. Gerçekleştirilen yüksek lisans tez projesi kapsamında en yüksek çeşitlilik *rnl*'de belirlenmiş, *cox3*'ün bir türün bireyleri arasında farklılık taşıyabileceği gösterilmiştir. ATP sentezin alt birimini şifreleyen *atp9*'un ise en düşük varyasyonu taşıdığı ortaya konmuştur. Bu yüksek lisans tez projesinde, filogenetik ilişki *Fusarium* türlerinde mitokondri genlerinin dizilemesi ile ilk defa kurulduğundan yüksek özgün değere sahiptir. İzlenen metodoloji diğer fitopatojenlerin karakterizasyonunun yapılmasına örnek oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Aguileta, G., de Vienne, D., M., Ross, O., N., Hood, M., E., Giraud, T., Petit, E., Gabaldon, T., 2014, High variability of mitochondrial gene order among fungi, *Genome biology and evolution advance*, DOI:10.1093/gbe/evu028.
- Al-Reedy, R., M., Malireddy, R., Dillman, C., B., Kennell, J., C., 2012, Comparative analysis of *Fusarium* mitochondrial genomes reveals a highly variable that encodes an exceptionally open reading frame, *Fungal genetics and biology*, 49, 1-14.
- Andersson, S., G., E., Zomorodipour A., Andersson, J., O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U., C., Podowski, R., M., Näslund, A., K., Eriksson, A., S., Winkler, H., H., Kurland C., G., 1998, The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria, *Nature*, 396, 133-143.
- Andersson, S., G., E., Kurland, C., G., 1999, Origins of mitochondria and hydrogenosomes, *Current opinion in microbiology*, 2, 535-541.
- Backeljau, T., De Bruyn, L., De Wolxt, H., Jordaens, K., Van Dongen, S., Winnepenninck, B., 1996, Multiple UPGMA and Neighbor-joining Trees and the Performance of Some Computer Packages, *Molecular biology and evolution*, 13 (2), 309-313.
- Ballamos C., Wiedenmann, A., Dimroth., P., 2009, Essentials for ATP synthesis by F_1F_0 ATP synthases, *Annual review of biochemistry*, 78, 649-672.
- Basse, C., W., 2010, Mitochondrial inheritance in fungi, *Current opinion in microbiology*, 13, 712-719.
- Booth, C., 1977, *Fusarium laboratory guide to the identification of the major species*. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew Surrey.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L., 1972, Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by r-factor DNA, *Proceedings of the national sciences*, 69 (8), 2110-2114.
- Cummings, D., J., Michael F., McNally, K., L., 1989, DNA sequence analysis of the 24,5 kilobase pair cytochrome oxidase subunit I mitochondrial gene from *Podospira anserina*: a gene with sixteen intron, *Current genetics*, 16, 381-406.
- Cummings D., J., McNally, K., L., Domenico, J., M., Matsuura E., T., 1990, The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospira anserina*, *Current genetics*, 17, 375-402.

- Cuomo, C.A., Guldener, U., XU, J.R., Trail, F., Turgeon, B.G., Pietro, A.D., Walton, J.D., MA, L.J., Baker, S.E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y.L., Decaprio, D., Gale, L.R., Gnerre, S., Goswami, R.S., Kosack, K.H., Harris, L.J., Hilbrun, K., Kennell, J.C., Kroken, S., Magnuson, J.K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H.W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., munsterkotter, M., Nelson, D., O'donnell, K., Quellet, T., QI, W., Quesneville, H., Roncero, M.I.G., Seong, K.Y., Tetko, I.V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T.J., Yao, J., Birren, B.W., Kistler, H.C., 2007, The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization, *Science*, 317, 1400-140.
- Déquard-Chablet, M., Sellam, C., H., Golik, P., Bidard, F., Martos, A., Bietenhader, M., di Rago, J., P., Sainsard-Chanet, A., Denmat, S., H., Contamine, V., 2011, Two nuclear life cycle-regulated genes encode interchangeable subunits c of mitochondrial ATP synthase in *Podospira anserina*, *Molecular biology evolution*, 28 (7), 2063-2075.
- Doyle JJ. Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, 1987, *Phytochemical bullutein*, 19, 11-15.
- Dujon, B., 1989, Grup I introns as mpbile genetic elements: facts and mechanistic spevulation- a rewiev, *Gene*, 82, 91-114.
- Forget L., Ustinova, J., Wang, Z., Var, H., 2002, Hyaloraphidium curvatum: A linear mitochondrial genome, tRNA editing, and evolutionary link to lower fungi, *Molecular biology evolution*, 19, 310-319.
- Gerlach, W., Nirenberg, H., 1982, The genus *Fusarium*, A pictorial atlas. *Kommissions Paul Parey*, Berlin-Hamburg.
- Gledhill, J., R., Walker, J., E., 2006, Inhibitors of the catalytic domain of mitochondrial ATP synthase, *Biochemical society transactions*, 34, 989-992.
- Gray, M.W., 1999, Evolution of organellar genomes, *Current opinion genetics and development*, 9, 678-687.
- Gray, M., W., 2001, The origin and early evolution of mitochondria, *Genome biology*, DOI:10.1186/gb-2001-2-6-reviews1018.
- Gray, M., W., Burger, G., Lang, B., F., 2012, Mitocnondrial evolution, Cold spring harbor laboratory pres, DOI: 10.1101/cshperspect.a011403.
- Griffiths, A., J., F., 1992, Fungal senecence, *Annual rewiev of genetics*, 26, 351-372.
- Grivennikova, V., G., Kotlyar, A., B., Karliner, J., S., Cecchini, G., Vinogradov, A., D., Redox-Dependent Change of Nucleotide Affinity to the Active Site of the Mammalian Complex I, *Biochemistry*, 46, 10971-10978.
- Goswami, R., S., Kistler, C., 2004, Heading for disaster: *Fusarium graminearum* in cereal crops, *Molecular Plant Pathology*, 5 (6), 515-525.

- Haltia, T., Saraste, M., Wikström, M., 1991, Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: a site-directed mutagenesis study, *The EMBO journal*, 10 (8), 2015-2021.
- Hausner G., 2003, Fungal mitochondrial genomes, plasmids and introns, *Applied mycology and biotechnology*, 3, 101-131.
- Hensgens, L., A., M., Grivel, L., A., Borst, P., Bos, J., L., 1979, Nucleotide sequence of the mitochondrial structural gene for subunit 9 of yeast ATPase complex, *Proceedings of the national academy of sciences*, 76 (4), 1663-1667.
- Kazak, L., Reyes, A., Holt, I., J., 2012, Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact, *Nature reviews*, 13, 659-671.
- Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh., B., Hornok, L., 2004, Mating Type Sequences in Asexually Reproducing *Fusarium* Species, *Applied and environmental microbiology*, 70 (8), 4419-4423.
- Kim, D., H., Martyn, R., D., Magill, C., W., 1992, Restriction length polymorphism groups and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*, *Molecular plant pathology*, 82, 346-353.
- Kim., D., H., Martyn, D., Magill, C., W., 1993, Mitochondrial DNA (mtDNA) relatedness among formae speciales of *Fusarium oxysporum* in the Cucurbitaceae, *Genetics*, 83 (1), 91-97.
- Kistler, H., C., Bosland, P., W., Benny, U., Leong, S., Williams, P., H., 1987, Relatedness of Strains of *Fusarium oxysporum* from Crucifers Measured by Examination of Mitochondrial and Ribosomal DNA, *Genetics*, 77, 1289-1293.
- Kretzer, A., M., Bruns, T., D., 1999, Use of *atp6* in fungal phylogenetics: an example from the boletales, *Molecular phylogenetics and evolution*, 13 (3), 483-492.
- Láday, M., Juhász, Á., Mulé, G., Moretti, A., Szécsi, Á., Logrieco, A., 2004a, Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*), *European journal of plant pathology*, 110, 545-550.
- Láday, M., Mulé, G., Moretti, A., Szécsi, Á., Z. Hamari, Z., Juhász, Á., Szécsi, Á., Logrieco, A., 2004b, Mitochondrial DNA variability in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*), *European journal of plant pathology*, 110, 563-571.
- Laday, M., stubnya, V., Hamari, Z., Hornok, L., 2008, Characterization of a new mitochondrial plasmid from *Fusarium proliferatum*, *Plasmid*, 59, 127-133.
- Lang, B., F., 1984, The mitochondrial genome of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: highly homologous introns are inserted at the same position of the otherwise less conserved *cox1* genes in *Schizosaccharomyces pombe* and *Aspergillus nidulans*, *EMBO journal*, 3, 2129-2136.

- Lang, B., F., Cedergren, R., Gray, M., 1987, The mitochondrial genome of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe* sequence of the large-subunit ribosomal RNA gene, comparison of potential secondary structure in fungal mitochondrial large-subunit rRNAs and evolutionary considerations, *European Journal of Biochemistry*, 169, 527-537.
- Lee, J., Chang, I., Y., Kim, H., Yun, S., H., Leslie, J., F., Lee, Y., W., 2009, Genetic Diversity and Fitness of *Fusarium graminearum* Populations from Rice in Korea, *Applied And environmental microbiology*, 75 (10), 3289–3295.
- Li, P., M., Morgan, J., E., Nilsson, T., Ma, M., 1988, The nature of CuA in cytochrome c oxidase, *Biochemistry*, 27, 7538-7546.
- Link, H., F., 1809, Observationes in ordines plantarum naturalis, Dissertatio, I, Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berlin 3, 3.
- Maheswari, R., 2007, Fungi, Experimental methods in biology, Taylor&Francis Group, New York.
- Malmström, B., G., 1989, The mechanism of proton translocation in respiration and photosynthesis, *FEBS letters*, 250, 9-21.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, Molecular cloning: a laboratory manual, Cold spring harbor laboratory press, NY.
- Moretti, A., 2009, Taxonomy of *Fusarium* genus, a continuous fight between lumpers and splitters, *Proceedings natural science*, 117, 7-13.
- Müller M., Martin, W., 1999, The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts on the origin of mitochondria and hydrogenosomes, *Bioessays*, 21, 377-381.
- Nirenberg, H., 1976, Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*., *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*, 169, 1–117.
- O'Donnell, K., Kistler, H., C., Tacke, B., K., Casper, H., H., 2000, Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab, *Proceedings of the national academy of sciences*, 97, 7905-7910.
- Pereira C., Silva, R., D., Saraiva, L., Johansson, B., Sousa, M., J., Côrte-Real, M., 2008, Mitochondria-dependent apoptosis in yeast, *Biochimica et biophysica acta*, 1783, 1286-1302.
- Poole, A., M., Penny, D., 2006, Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes, *Bioessays*, 29, 74-84.
- Sackman, U., Zensen, R., Röhlen, D., Jahnke, U., Weiss, H., 1991, The acyl-carrier protein in *Neurospora crassa* mitochondria is a subunit of NADH : ubiquinone reductase (complex I), *European journal of biochemistry*, 200, 463-469.

- Scheffler, I., E. 2008, Mitochondria, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, USA, ISBN 978-0-470-04073-7.
- Stade, S., Brambl, R., 1981, Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: respiration and cytochrome c oxidase in *Neurospora crassa*, *Journal of bacteriology*, 147 (3), 757-767.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Molecular biology and evolution*, 30 (12), 2725-2529.
- Trail, F., 2009, For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era, *Plant physiology*, 149, 103-110
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamauchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S., 1996, The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2,7 Å, *Science*, 272 (5265), 1136-1144.
- Wasterman, B., 2010, Mitochondrial fusion and fission in cell life and death, *Nature reviews molecular cell biology*, 11, 872-884.
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G., Preis, D., 1991, The respiratory chain NADH-dehydrogenase (complex I) of mitochondria, *European journal of biochemistry*, 197, 563-576.
- Yang, Z., 1996, Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Likelihood Methods, *Journal of molecular evolution*, 42, 294-307.
- Yli-Mattila T., Gagkaeva T., Ward T.J., Aoki T., Kistler H.C., O'Donnell K., 2009, A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East, *Mycologia*, 101, 841-852.
- Yörük, E., Albayrak, G., 2013, Genetic characterization of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by using random-amplified polymorphic DNA, *Genetics and molecular research*, 12 (2), 1360-1372.
- Yörük, E., Gazdaglı, A., Albayrak, G., 2014, Class B trichothecene chemotyping in *Fusarium* species by PCR assay, *Genetika-Belgrade*, 46 (3), 661-669.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Aylin GAZDAĞLI
Uyruđu	T.C.
Dođum tarihi, Yeri	09.07.1991, İSTANBUL
Telefon	0212 455 57 00/15110
E-mail	aylin.gazdagli@ogr.iu.edu.tr

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D. /Moleküler Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı	2015
Lisans	İ.Ü. Fen Fakóltesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2013
Lise	Borsa İstanbul Zeytinburnu Anadolu Lisesi	2009

Makaleler / Bildiriler

- Gazdagli, A.**, Albayrak, G., 2015, Characterization of cox3 gene found in mitochondria of *Fusarium graminearum*, Ulusal 4. Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi
- Yörük, E., **Gazdagli, A.**, Albayrak, G., 2014, Class B trichothecene chemotyping in *Fusarium* species by PCR assay, *Genetika-Belgrade*, 46 (3), 661-669.
- Yörük, E., **Gazdagli, A.**, Karlik, E., Kayış, M., Kaya, F., Albayrak, G., 2013, Mycotoxin profiling of *Fusarium* spp. From Turkey | Second International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey 2013, 22-23th November, Istanbul, Turkey, Abstract Book, pt-78.

- Yörük, E., **Gazdağlı, A.**, Albayrak, G., 2012, Genotyping of *Fusarium graminearum* and *F.culmorum* isolates by microsatellite markers, Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium, 12-14 April, Kayseri, Turkey, Journal of Biotechnology, S 16
- Yörük, E., **Gazdağlı, A.**, Albayrak, G., 2012, Geliştirilen Yeni Genik Mikrosatellit Markırlarının Fusarium graminearum ve Fusarium culmorum İzolatlarında Analizi, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül, İzmir, S 314-315